

Biocompatible polymers having carboxyl and sulfate or sulfonate groups, have a similar action to HBGFPP but with a broader field of application

Publication number: FR2781485

Publication date: 2000-01-28

Inventor: BARRITAU LT DENIS; CARUELLE JEAN PIERRE

Applicant: BARRITAU LT DENIS (FR)

Classification:

- international: A61K9/08; A61K47/48; A61P1/00; A61P3/00; A61P9/10; A61P9/12; A61P17/02; A61P17/16; A61P21/00; A61P25/00; A61P29/00; A61P31/00; A61P31/08; A61P39/00; A61P39/06; A61P43/00; C08B37/02; C08G63/688; C08G85/00; A61K9/08; A61K47/48; A61P1/00; A61P3/00; A61P9/00; A61P17/00; A61P21/00; A61P25/00; A61P29/00; A61P31/00; A61P39/00; A61P43/00; C08B37/00; C08G63/00; C08G85/00; (IPC1-7): C08B37/02; A23L3/3535; A61K31/715; A61K31/765; A61P21/00; A61P29/00; A61P31/00; C08G63/08

- european: C08B37/00M2F; C08G63/688B

Application number: FR19980009309 19980721

Priority number(s): FR19980009309 19980721

Also published as:

 WO0005270 (A1)
 EP1117695 (A1)
 US6689741 (B2)
 US2001021758 (A1)
 EP1117695 (A0)

more >>

Report a data error here

Abstract of FR2781485

Biocompatible polymers having a molecular weight of at least 5000, comprising polymerized monomer with carboxyl and sulfate or sulfonate groups. The new polymers are of formula (I) Aa-Xx-Yy (I) A = a monomer; X = a carboxyl group fixed on monomer A and of formula R-COO-R'; R = a bond or aliphatic hydrocarbon chain which may be branched and/or unsaturated and which may contain one or more aromatic rings, other than benzylamine and benzylamine sulfonate; R' = H or a cation; Y = a sulfate or sulfonate group fixed on to A and of formula -R-O-SO₃-R', -R-N-SO₃-R' or -R-SO₃-R'; a = the number of units of monomer A, and is such as to give (I) a molecular weight of at least 5000; x = the degree of substitution of all monomers A by groups X and is 20 - 150%, preferably around 50%; y = the degree of substitution of all monomers A by groups Y and is 30 - 150%, preferably around 100% Preferably the monomers A are sugars, esters, alcohols, amino acids or nucleotides, glucose units being especially preferred. The groups R are preferably straight or branched alkyl, allyl, or aryl groups. The polymers may further contain groups Z, which are different to X and Y and which confer supplementary biological or physicochemical properties on the polymer, such as increased solubility or lipophilicity. Suitable such groups Z include amino acids, fatty acids and alcohols, ceramides, and nucleotide sequences.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE LEFT BLANK

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

2 781 485

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

98 09309

⑤1 Int Cl⁷ : C 08 B 37/02, C 08 G 63/08, A 61 K 31/715, 31/765,
A 23 L 3/3535, A 61 P 21/00, 29/00, 31/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 21.07.98.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 28.01.00 Bulletin 00/04.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : BARRITault DENIS — FR et
CARUELLE JEAN PIERRE — FR.

⑦2 Inventeur(s) : BARRITault DENIS et CARUELLE
JEAN PIERRE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : BREESE MAJEROWICZ.

⑤4 POLYMERES BIOCOMPATIBLES LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LES COMPOSITIONS LES
CONTENANT.

⑤7 La présente invention concerne un polymère biocom-
patible constitué par un enchaînement de motifs identiques
ou différents, de formule générale (I) suivante: $A_a X_x Y_y$,
dans laquelle: A représente un monomère; X représente un
groupement carboxyle fixé sur un monomère A; Y représen-
te un groupement sulfate ou sulfonate fixé sur un monomère
A; a représente le nombre de monomères A; x représente le
taux de substitution de l'ensemble des monomères A par les
groupements X; y représente le taux de substitution de l'en-
semble des monomères A par les groupements Y.

L'invention concerne également les compositions phar-
maceutique et de diagnostic comprenant au moins un poly-
mère de formule générale (I).

FR 2 781 485 - A1



POLYMÈRES BIOCOMPATIBLES LEUR PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET LES COMPOSITIONS LES CONTENANT.

5 La présente invention concerne de nouveaux polymères biocompatibles, leur procédé de préparation et les compositions les contenant.

On connaît dans l'art antérieur des polymères dérivés de dextranes obtenus par substitution
10 par des résidus carboxyméthyle, carboxyméthyle-benzylamide et carboxyméthyle-benzylamide-sulfonate. Ces polymères, leur procédé de préparation et leur propriété ont été décrits dans le brevet Français No. 2 461 724 ainsi que dans le brevet US No. 4 740 594. Parmi ces
15 polymères, certains miment les propriétés de l'héparine et peuvent être utilisés en tant que produits de substitution du plasma grâce à leurs propriétés anti-coagulante et anti-complémentaire. D'autres miment une propriété différente de l'héparine qui consiste en une
20 stabilisation, une protection et une potentialisation de l'activité biologique *in vitro* des facteurs de croissance de la famille des FGF (Tardieu et coll., Journal of Cellular Physiology, 1992, 150, Pages 194 à 203).

25 Par ailleurs, le brevet Français No. 2 644 066 décrit l'utilisation de dérivés de dextrane carboxyméthyl-benzylamide-sulfonate, désignés CMDBS, seuls ou associés aux FGFs pour la cicatrisation.

Plus récemment, il a été proposé dans les
30 brevets Français No. 2 718 023, No. 2 718 024 et No. 2 718 026 d'utiliser des polymères capables de protéger, stabiliser et potentialiser les facteurs de croissance à affinité pour l'héparine, tels les facteurs de croissance des fibroblastes ou FGF et du Transforming
35 Growth Factor bêta (TGF β), comme médicament pour le traitement des lésions respectivement du tractus

digestif, du système nerveux, des tissus musculaires. Pour illustrer cet effet protecteur des dérivés de dextrane CMDBS, ces brevets rapportent les résultats de la digestion protéolytique par de la trypsine du FGF1, du FGF2 ou du TGF β . Ces propriétés de protection, de stabilisation et de potentialisation des facteurs de croissance à affinité pour l'héparine ont permis de caractériser une nouvelle classe de polymères, désignés HBGFPP pour "Heparin-Binding Growth Factor Protector and Potentiator", présentant une activité cicatrisante et réparatrice des tissus musculaires, nerveux et du tractus digestif et dépourvus, aux doses utilisées, d'activités anticoagulantes.

Outre, les applications des HBGFPP ci-dessus, le brevet Français No. 2 718 025 propose l'utilisation de ces polymères comme médicament pour le traitement des inflammations. Cette activité anti-inflammatoire est illustrée par l'activité d'inhibition *in vitro* d'enzymes protéolytiques impliquées dans la réaction inflammatoire comme l'élastase leucocytaire ou la plasmine et *in vivo* par des études histologiques démontrant une réaction cellulaire inflammatoire réduite dans les tissus traités par des dérivés de dextrane CMDBS.

Toutefois, les dérivés de dextrane CMDBS sont des composés dont la synthèse est difficile et qui présentent le risque de relarguer des résidus connus pour leurs effets toxiques comme la benzylamine.

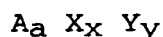
En outre, les applications des HBGFPP et donc du CMDBS proposées dans l'art antérieur sont limitées à la réparation et à la cicatrisation de certains tissus seulement.

La présente invention vise précisément à palier ces inconvénients en offrant de nouveaux polymères biocompatibles faciles à préparer et présentant les propriétés des HBGFPP mais aussi, de

façon inattendue, de nouvelles propriétés permettant des champs d'application notamment thérapeutiques très étendus qui ne sont pas limités à quelques types de d'organes, de tissus ou de cellules particuliers.

5 Les polymères de l'invention seront aussi désignés ci-après "RGTA" pour "ReGeneraTing Agents" (Agents de régénération).

10 Les polymères de l'invention ont une masse molaire supérieure à environ 5 000 Daltons et sont constitués par un enchaînement de motifs identiques ou différents, de formule générale (I) suivante :



dans laquelle :

15 - A représente un monomère;
- X représente un groupement carboxyle fixé sur un monomère A et répondant à la formule suivante :
-R-COO-R', où R est une liaison ou une chaîne hydrocarbonée aliphatique, éventuellement ramifiée et/ou
20 insaturée et qui peut contenir un ou plusieurs cycles aromatiques à l'exception de la benzylamine et de la benzylamine sulfonate, et R' représente un atome d'hydrogène ou un cation,

25 - Y représente un groupement sulfate ou sulfonate fixé sur un monomère A et répondant à l'une des formules suivantes : -R-O-SO₃-R', -R-N-SO₃-R', -R-SO₃-R', où R est une liaison ou une chaîne hydrocarbonée aliphatique, éventuellement ramifiée et/ou insaturée et qui peut contenir un ou plusieurs cycles aromatiques à
30 l'exception de la benzylamine et de la benzylamine sulfonate, et R' représente un atome d'hydrogène ou un cation,

35 - a représente le nombre de monomères A, qui est tel que la masse desdits polymères de formule (I) est supérieure à environ 5 000 daltons

- x représente le taux de substitution de l'ensemble des monomères A par les groupements X, lequel est compris entre environ 20 et 150%, et de préférence est de l'ordre de 50%,

5 - y représente le taux de substitution de l'ensemble des monomères A par les groupements Y, qui est compris entre environ 30 et 150%, et de préférence est de l'ordre de 100%.

10 Avantageusement dans la formule (I), le radical R des groupement X et Y, est choisi parmi un groupement alkyle, allyle, aryle, linéaires ou ramifiés.

15 Dans la définition des taux de substitutions ci-dessus, on entend par un taux de substitution x de 100 %, le fait que chaque monomère A du polymère de l'invention contient statistiquement un groupement X. De même, on entend par un taux de substitution y de 100 %, le fait que chaque monomère du polymère de l'invention contient statistiquement un groupement Y. Les taux de substitution supérieurs à 100 % traduisent le fait que chaque monomère porte statistiquement plus d'un groupement du type considéré; à l'inverse, les taux de substitution inférieurs à 100 % traduisent le fait que chaque monomère porte statistiquement moins d'un groupement du type considéré.

25 Les polymères offrent l'avantage remarquable de présenter *in vivo* une dégradabilité lente, ce qui les différencient des héparanes sulfates qui sont des produits naturellement et rapidement dégradés par l'héparinase ou l'héparitinase. En outre, les polymères de l'invention ne contiennent pas ou ne libèrent après dégradation des produits toxiques contrairement au CMDBS qui possèdent des groupements benzylamines.

35 Les monomères A qui constituent les éléments de base des polymères de formule I peuvent être

identiques ou différents, et sont choisis parmi tout type de monomère, comme par exemple ceux proposés pour les HBGFPP tels que des sucres, des esters, des alcools, des acides aminés, des nucléotides, etc.... Parmi ceux-ci, on préfère plus particulièrement les oses et notamment le glucose.

Le nombre de monomères A est défini de façon à ce que la masse des polymères de l'invention soit supérieure à environ 5 000 daltons. En conséquence, les RGTA peuvent être constitués de diverses structures polymérisables homomériques comme hétéromériques comme par exemple : les copolymères polyesters de biosynthèse ou de synthèse chimique comme les polyesters aliphatiques ou ceux d'origine naturelle comme les polyhydroxyalcanoates. Il peut aussi s'agir de polysaccharides et de leurs dérivés qu'ils soient d'origine bactérienne comme la cellulose, le xanthane, le dextrane, etc..., extraits des végétaux unicellulaires ou pluricellulaires comme l'amidon, la cellulose végétale ou les alginates et leurs dérivés, les fucanes et leurs dérivés, etc... ou encore extraits des animaux comme l'acide hyaluronique ou la chitine, etc... ou de synthèse obtenu par exemple par copolymérisation. Des protéines de synthèse comme des poly acides aminés naturels ou chimiquement modifiés, comme par exemple le collagène, peuvent également entrer dans la constitution des polymères de l'invention.

Le choix de la structure polymérique des RGTA repose sur les différentes formes de présentation susceptibles d'être utilisées selon le tissu ou l'organe à traiter ou des caractéristiques physico-chimiques comme la solubilité, la conformation spatiale avec des solutions, des suspensions, des gels, des poudres des éponges, des films, des matériaux modelables compacts, poreux semi-poreux ou non poreux, délitables ou non érodables ou non, colonisables ou non, etc...

L'héparine ou ses fragments à faible propriété anticoagulante et les héparanes sulfatés naturels et leurs fragments sont exclus du champ de la présente invention, car :

5 - Leur activité anti-coagulante peut être supérieure à 50 UI. En effet, les polymères de l'invention sont dépourvus d'activité anticoagulante significative, c'est à dire qu'ils présentent une
10 activité inférieure à 50 UI/milligramme comparée à celle de l'héparine dont l'activité est de l'ordre de 150 à 170 UI/milligramme.

 - Ils présentent une biodégradabilité trop
15 rapide sous l'action d'enzymes de type héparinase ou héparitinase pour permettre les effets biologiques obtenus dans le cadre de la présente invention.

 Les polymères de l'invention peuvent également comprendre des groupements chimiques fonctionnels, désignés Z, différents de X et Y, capables
20 de conférer aux polymères de l'invention des propriétés biologiques ou physicochimiques supplémentaires. Ainsi, les groupement Z sont utiles pour conférer aux RGTA une meilleure solubilité ou lipophilie permettant une meilleure diffusion ou pénétration tissulaire, par
25 exemple accroître l'amphiphilie, permettre le franchissement de la barrière hématoencéphalique, etc... A titre d'exemple, les groupements Z, identiques ou différents, peuvent être des acides aminés, des acides gras, des alcools gras, des céramides, ou des dérivés de
30 ceux-ci, ou encore des séquences nucléotidiques d'adressages, etc...

 Les groupement Z peuvent aussi représenter des agents actifs identiques ou différents, comme des
35 agents thérapeutiques ou de diagnostic, par exemple un anti-inflammatoire, un anti-microbien, un antibiotique,

etc..., ou encore une enzyme, un facteur de croissance, etc....

Des polymères de l'invention dans lesquels Z est présent répondent à la formule II suivante :

5 $A_a X_x Y_y Z_z$

dans laquelle, A, X, Y, a, x, y ont la même signification que précédemment et z représente le taux de substitution de l'ensemble des monomères A par des groupements Z, qui est compris entre 0 et 50 %, et de
10 préférence de l'ordre de 30%.

Les groupements X, Y et Z peuvent être fixés directement sur le monomère A ou bien fixés les uns aux autres, l'un seulement étant fixé au monomère A.

Ainsi, les groupements Z peuvent être fixés
15 par covalence directement sur les monomères A ou fixés par covalence sur les groupements X et/ou Y.

Mais, les groupements Z peuvent aussi être conjugués aux polymères de formule (I) par des liaisons autres que covalentes, comme des interactions ioniques ou hydrophiles, selon la nature de A, X et Y. Les
20 polymères de l'invention peuvent alors constituer un système de vectorisation de Z. Ainsi, les polymères de l'invention sont utiles pour véhiculer un agent actif Z, comme un facteur de croissance ou une enzyme, au niveau
25 de tissus lésés ou souffrant définis plus loin dans le cadre des applications des polymères de l'invention.

Les polymères dans lesquels les groupes R de X et Y ou les groupements Z sont susceptibles d'induire
30 directement ou après dégradation des effets toxiques n'entrent pas dans le cadre de la présente invention. On peut citer parmi les groupements Z exclus de l'invention, ceux qui constituent des agents mutagènes ou connus pour être carcinogènes ou ayant d'autres
35 toxicités. Ceci est le cas de la benzylamine qui peut être relarguée à partir du groupement benzylamide

contenu dans le CMDBS et dont les propriétés
carcinogènes sont bien connues de l'homme de l'art
(Wiessler M, et al., Carcinogenesis. 1983; 4(7): 867-871
; Singer GM, et al., J Med. Chem. 1983; 26(3): 309-312).
5 En conséquence, le CMDBS est exclu des polymères de
l'invention.

L'invention concerne aussi les compositions
pharmaceutiques ou de diagnostic contenant au moins un
10 polymère défini ci-dessus associé dans ladite
composition avec un véhicule pharmaceutiquement
acceptable. Ces compositions sont utilisables chez
l'homme comme chez l'animal. En effet, comme les HBGFP
décrits dans l'art antérieur, les polymères de
15 l'invention présentent les propriétés suivantes:

- Ils sont dépourvus d'activité
anticoagulante significative, ce qui signifie qu'ils
présentent une activité inférieure à 50 UI/milligramme
comparée à celle de l'héparine dont l'activité est de
20 l'ordre de 150 à 170 UI/milligramme.

- Ils stabilisent et potentialisent les
facteurs de croissance présentant une affinité pour
l'héparine et en particulier à titre d'exemple le FGF1
et/ou le FGF2 et le TGF β .

- 25 - Ils protègent ces facteurs contre des
agents protéolytiques comme la trypsine.

- Ils inhibent les activités protéasiques
impliquées dans le processus inflammatoire comme par
exemple élastase leucocytaire ou la plasmine.

- 30 - Ils exercent un effet cicatrisant dans au
moins les modèles présentés dans les brevets suscités,
sur les muscles, les nerfs ou le tractus digestif.

Les polymères de l'invention constituent
donc une nouvelle classe d'agents favorisant la
35 réparation des tissus musculaires, nerveux et du tractus
digestif et présentant, comme cela est rapporté dans le

brevet US No. 5 693 625 à propos du CMDBS, des propriétés sur la cicatrisation cutanée et de la cornée ou sur l'os plat tel que décrit par Blanquaert F, et al. (Bone, 1995; 17(6): 499-506). Mais, les polymères de l'invention présentent aussi des propriétés inattendues par rapport au CMDBS. On peut citer à titre d'exemple, l'effet du CMDBS sur la réparation des défauts osseux dans le crâne (Blanquaert F, et al., Bone, 1995; 17(6): 499-506)), qui a priori, n'était pas transposable sur l'os long. L'os plat et l'os long sont de nature totalement différente car :

- Ils sont d'origine embryologique différente. L'os plat est un dérivé des cellules du tissu conjonctif alors que l'os long dérive des cellules cartilagineuses.

- L'os plat est un os spongieux et ne contient pas de canal médullaire par opposition à l'os long.

- L'os plat ne cicatrise pas naturellement lorsqu'il y a une perte de substance comme lors d'une trépanation comme le montre l'absence de cicatrisation sur des crânes provenant de civilisations préhistoriques comme les Incas ou les Egyptiens (voir par exemple Evidence for stone age cranial surgery, 7000 BC, Nature, 1997, 367, 360). Or, de manière surprenante, les polymères de l'invention présentent des effets sur la réparation de défauts osseux très importants, de l'ordre du tiers de la longueur de la diaphyse d'un fémur de rat. Il a été observé non seulement une réparation avec la reformation d'un fût osseux mais aussi que celui ci était rempli de moelle osseuse, c'est à dire que le traitement par le RGTA a conduit à la reformation d'un véritable canal médullaire alors qu'en l'absence de RGTA le défaut est simplement comblé de matériel osseux désorganisé. Il en est de même des incisions cutanées

car cette réparation est d'une telle qualité qu'il n'y a pratiquement plus la trace d'une cicatrice.

5 De manière tout aussi surprenante, les
Inventeurs ont mis en évidence que les polymères de
l'invention peuvent être administrés par des voies
autres que celles décrites dans l'art antérieur pour les
les CMDBS qui n'envisageait qu'une administration
10 locale, au niveau du tissu lésé. Ainsi, il est possible
de choisir parmi les polymères de l'invention ceux qui
sont appropriés, par exemple du fait leur solubilité, au
mode d'administration choisi : intra veineuse, intra
artérielle, intra musculaire, intra péritonéenne, intra
oculaire, dans le liquide céphalorachidien ou
15 directement dans le système nerveux central de façon à
s'affranchir de la barrière hématoencéphalique ou encore
par voie orale; toutes ces voies d'administration,
éventuellement même combinées, se sont révélées
particulièrement efficaces.

20 L'invention se rapporte donc à toute
composition pharmaceutique dans laquelle le polymère de
l'invention est associé à un véhicule pharmaceutique
sous une forme permettant l'administration per os, per
cutanée, sous cutanée, topique, intramusculaire,
25 intraveineuse ou intra artérielle ou dans tous les
compartiments liquidiens de l'organisme. Les travaux
menés dans le cadre de la présente invention ont permis
de mettre en évidence que les RGTA agissent plus
particulièrement dans des fenêtres de doses en dehors
30 desquelles des effets biologiques toujours satisfaisants
ne sont pas obtenus. Selon les voies d'administration et
le type de lésion, les doses efficaces optimales sont
celles définies ci-dessous.

35 Avantageusement, de manière à recouvrir
toute la surface d'une plaie ou à remplir le volume
d'une lésion tissulaire, les compositions

pharmaceutiques de l'invention sont dosées de façon à permettre une administration de 0,001 à 1 milligramme de polymère par centimètre carré ou de 0,005 à 1 milligramme de polymère par centimètre cube de tissu à traiter. Ainsi, les compositions de l'invention contiennent de préférence entre 0,01 et 10 milligramme de polymère par millilitre de solution physiologique de dissolution.

Pour une administration par voie systémique (veineuse, artérielle), par voie intra-péritonéale, intra oculaire, dans le liquide céphalorachidien, dans le liquide intracochléaire ou dans tous fluides péri ou intra tissulaires, les compositions de l'invention sont dosées de façon à permettre une administration de 0,1 et 100 milligrammes de polymère par kilogramme de poids d'homme ou d'animal à traiter.

Pour une administration par voie intramusculaire, les compositions de l'invention sont dosées de façon à permettre une administration comprises entre 0,2 et 500 milligrammes de polymère par kilogramme de poids d'homme ou d'animal à traiter, et de préférence entre 1 et 50 mg par kg.

Pour une administration per os, les compositions de l'invention sont dosées de façon à permettre une administration comprise entre 1 et 5000 milligrammes de polymère par kilogramme de poids d'homme ou d'animal à traiter, et de préférence entre 10 et 500 mg par kg.

Outre, les propriétés des HBGFPP rapportées précédemment, à savoir qu'ils présentent une activité cicatrisante et réparatrice sur les tissus musculaires, nerveux et sur ceux du tractus digestif et qu'ils peuvent être utilisés comme médicament pour le traitement des inflammations, les Inventeurs ont mis en évidence les effets remarquables des polymères de l'invention sur la régulation de l'homéostasie de la

masse et de la fonctionnalité des tissus et des organes, en montrant qu'ils agissent sur la régénération, la protection, la préservation et le vieillissement tissulaire et cellulaire *in vivo* et *ex vivo*, ainsi que
5 des activités antifibrotiques et protectrices contre les effets délétères des ischémies, des radiations ionisantes et des produits oxydants induits lors de pathologies ou de stress ou encore apportés dans l'alimentation. En conséquence, les RGTA doivent être
10 considérés comme des régulateurs de l'homéostasie tissulaire en ce qu'ils régulent la masse des tissus régénérés et leur fonctionnalité et qu'ils agissent sur le remaniement matriciel en ce qu'ils exercent un effet antifibrotique et cicatriciel dans les tissus et organes
15 soumis à des processus destructeurs aigus comme chroniques.

Ces propriétés des RGTA se caractérisent par des effets uniques sur la qualité et la vitesse des réparations tissulaires. Ces effets se traduisent par
20 une reconstitution quasi complète et à l'identique de la structure tissulaire d'origine (avant lésion) et par l'absence presque totale de traces cicatricielles comme en particulier de signes de fibrose ou de perte de son intégrité fonctionnelle. Plus particulièrement, les
25 travaux de recherche rapportés plus loin dans la partie expérimentale ont mis en évidence les propriétés de protection et de régénération tissulaire *in vivo* des RGTA dans les modèles suivants :

- lésion de plaies cutanées,
- 30 - régénération de tissus osseux comme les os longs avec l'exemple du fémur,
- protection contre la perte de tissu osseux et de régulation de son remaniement dans un modèle de parodontie chronique,
- 35 - protection contre les effets délétères des rayonnements ionisants,

- protection contre les effets délétères des ischémies quelque soit leur localisation.

Ainsi, les propriétés ci-dessous des polymères de l'invention ont plus particulièrement été mises en évidence :

- Un effet protecteur contre les effets délétères liés au stress oxydatif et aux agents oxydants. Les polymères de l'invention agissent en particulier comme des agents protecteurs et potentialisateurs d'enzymes comme la super oxyde dismutase ou SOD. Cette propriété permet d'envisager l'utilisation des polymères de l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention des lésions et souffrances induites par un stress oxydatif et les agents oxydants. Mais cette propriété permet également d'utiliser les polymères de l'invention seul ou en association avec un autre composé comme agent de préservation d'aliments ou de nutriments contenant naturellement des antioxydants ou auxquels ont été ajoutés des agents antioxydants comme la SOD animale ou végétale.

- Un effet de préservation et de protection contre les ischémies. Cette propriété permet d'envisager l'utilisation des polymères de l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention des pathologies associées à une hypoxie, à une dégénérescence cellulaire comme les neuropathies, les myopathies, les hépatopathies, les néphropathies, les cardiopathies, etc.. et aux peroxydations des molécules comme les lipides. Cette propriété permet également d'utiliser les polymères de l'invention dans des compositions de préservation de la fonctionnalité des tissus et organes plus particulièrement en vue de leur conservation, des transports d'organes ex vivo, des transplantations d'organes, de leurs greffes comme de celles de prothèses.

5 - Une activité inhibitrice des enzymes de la famille des calpaines. Cette propriété permet d'envisager l'utilisation des polymères de l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention des maladies cardiaques et nerveuses.

10 - Une activité inhibitrice des enzymes de dégradation de l'héparine ou des héparanes sulfatés comme l'héparinase ou l'héparitinase. Cette propriété permet d'envisager l'utilisation des polymères de l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention des maladies associées à une croissance anarchique des cellules et aux processus pathologiques en relation avec une
15 angiogenèse.

 - Une activité de protection des cellules contre les effets des radiations ionisantes et de régulation tant quantitative que qualitative des
20 constituants de la matrice cellulaire comme par exemple les collagènes, permettant d'augmenter la survie et le fonctionnement des cellules. Cette activité permet d'envisager l'utilisation des polymères de l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention des effets délétères
25 des radiations ionisantes ainsi que l'utilisation de ces polymères dans la préparation de produit cosmétologiques.

 - Une activité d'agent anti-fibrotique qui se manifeste *in vitro* et *in vivo* par des effets régulateurs sur la prolifération des cellules mésenchymateuses comme les cellules musculaires lisses, les fibroblastes ou les cellules hépatiques et la qualité du type de collagène qu'elles sécrètent, ainsi qu'une activité sur la qualité phénotypique des collagènes synthétisés par ces cellules et par la réduction notable des séquelles cicatricielles

fibrotiques. Cette activité permet d'envisager l'utilisation des polymères de l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention des pathologies pulmonaires rénales, hépatiques, cardiaques, vasculaires, dermatologiques, des greffes et de leur intégration fonctionnelle, des dérives multiples liées aux parasistismes.

Ainsi, d'une manière inattendue, les inventeurs ont découvert que les RGTA présentaient la capacité de:

- protéger, stabiliser les activités enzymatiques de la Super Oxyde Dismutase ou SOD.
- potentialiser les activités enzymatiques de la Super Oxyde Dismutase ou SOD

Cet enzyme peut donc être protégée soit *in situ* et *in vivo* soit *ex vivo*. Les RGTA peuvent donc être utilisés seuls comme agents protecteurs de la SOD endogène et à ce titre protéger celle ci dans toutes ses fonctions ou en association avec la SOD dans les indications connues de l'homme de l'art dans le domaine thérapeutique ou cosmétique. Ils agissent, par cette propriété, également comme préservateurs d'aliments ou de nutriments ou nutriments.

Les RGTA agissent donc comme des agents protecteurs et réparateurs des effets délétères associés au stress tissulaire. Ainsi, lors d'une ischémie quelqu'en soit l'origine, ou lors de la réponse à une agression cellulaire ou tissulaire par exemple sous l'effet de rayonnement ionisants ou en réponse à une invasion par un agent pathogène, de quelque nature qu'il soit viral, microbien, parasitaire ou même provoquant des pathologies de type ESST (Encéphalopathies spongiformes subaigue transmissible) comme celle provoquée par le prion, ou encore lors de rupture vasculaire provoquant des hémorragies dont les effets

sont nocifs en provoquant des pertes fonctionnelles, par exemple dans le cas d'hémorragies des vaisseaux rétiniens qui peuvent conduire à la cécité ou dans le cerveau à des pertes de fonctions motrices ou autres.

5 En conséquence, l'invention concerne des compositions pharmaceutiques comprenant au moins un RGTA tant dans des domaines d'applications chez l'homme que chez l'animal. Ces compositions sont bénéfiques tant
10 dans les domaines médicales, vétérinaires et cosmétologiques que dans les domaines alimentaires comme des agents de préservation d'aliments ou de nutriments contenant naturellement des antioxydants ou auxquels ont été ajoutés des agents antioxydants comme de la SOD animale ou végétale.

Les qualités protectives de la SOD endogène ou apporté d'une manière exogène sont renforcées par les RGTA. Ainsi, les RGTA peuvent être administrés dans tous les cas où l'effet bénéfique de la SOD a été décrit.

Pour le traitement de maladies dans lesquelles la SOD en apport exogène a été montrée comme efficace, l'effet thérapeutique résultant d'une action protectrice de la SOD endogène peut alors agir plus efficacement en présence de RGTA. Les RGTA limitent ou évitent des apports exogènes en agissant indirectement comme agents anti oxydants. Ils résultent de ces propriétés les effets thérapeutiques suivants :

- Une protection contre les agressions la souffrance ou la dégénérescence des tissus nerveux. Par exemple, dans le stress (Shahen et col., Effects of various stressors on the level of lipid peroxide antioxidants and Na^+ , K^+ - ATPases activity in brain, Experientia, 1996, 52, 336-339) ou encore dans la dégénérescence neuronale et les maladies neurodégénératives associés aux accidents vasculaires, traumatiques, ou à des pathologies comme le Parkinson,

dans lesquelles les activités de protection de la SOD endogène permettent une lutte plus efficace (Bostantjopoulos et col., Super oxide dismutase activity in early and advanced Parkinson's Disease, Funct. Neurol., 1997, 12, 63-68).

- Le vieillissement par un effet anti-apoptose (Fernandez Novoa et coll., Methods Find Exper Clin Pharmacol, 1997, 9, 99-106).

- Une protection antioxydante dans les ischémies des membres. Dans cette application le RGTA peut être administré seul. La protection assurée par un traitement avec la SOD seule serait bien évidemment renforcé par l'administration de RGTA. Il apparaît au vue des propriétés décrites que les RGTA seraient bénéfiques administrés seuls et/ou en association avec la SOD dans les nombreuses applications décrivant les effets de la SOD (D'Agnillo et Chang, *Reduction of hydroxyl radical generation in a rat hindlimb model of ischemia - reperfusion injury using cross linked hemoglobin - superoxide dismutase - catalase*, Artif. Cells Blood Substiti Immobil Biotechnol, 1997, 25, 163-80).

- L'administration de RGTA seuls ou en association avec de la SOD sera bénéfique contre les souffrances du coeur, du cerveau, du système nerveux central comme dans le cas des lésions de la moelle épinière (Nakauchi et col., *Effects of lecithinized super oxide dismutase on rat spinal cord injury*, J. Neurotrauma, 1996, 13, 573-82) ou encore de la rétine.

- Dans le traitement des insuffisances respiratoires associées à la fatigue du diaphragme (Supinski et col., *Effect of free radical scavengers on diaphragmatic fatigue*, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1997, 155, 622). Ceci pourrait-être notamment intéressant chez les malades atteints de dystrophie musculaires.

- Tous les tissus notamment ceux pour lesquels le taux de SOD active endogène est plus élevé (cellules endothéliales vasculaires, dans le foie, le rein, le muscle cardiaque et squelettique, le pancréas, les cellules épithéliales des muqueuses de l'intestin, du colon, de la trachée, de l'oesophage, des tissus conjonctifs, du cartilage).

- Le traitement des effets délétères associés au diabète comme dans les rétinopathies diabétiques (Szabo et col., *Direct measurement of free radicals in ischemic/reperfused diabetic rat retina*, Clin. Neurosci., 1997, 4, 240-5).

- Le traitement des lèpreux (Serum, zinc, copper, magnesium, proteins and super oxide dismutase in leprosy patients on multidrug therapy-a follow up study, Indian J. Lepr. 1996, 68, 325-33).

- Dans le traitement du choc endotoxique (*Hepatic response to the oxydative stress induced by E. Coli endotoxin*, Mol. Cell. Biochem. 1996, 159, 115-121).

- Dans le traitement des lésions induites par le stress causé par la présence d'agents pathogènes de toute nature, comme notamment les Virus dont le virus du sida ou les agents induisant des pathologies ESTT tels le prion.

- Dans le traitement préventif et/ou curatif contre les irradiations. Ainsi les effets adverses de la radiothérapie peuvent être réduits par un traitement préventif et/ou curatif de RGTA. L'utilisation des RGTA permet de réduire la dose de radiothérapie dans les conditions de traitement des cancers (*Prevention of radioinduced cystitis by orgotein; a random ranomized study*, Anticancer Res., 1996, 16, 2025-8) ou de prévenir les effets clastogéniques induits par l'irradiation. Les effets d'hyperthermie associés à la radiothérapie peuvent être diminués par l'utilisation de RGTA de la

même manière que la SOD (Kandasamy et col., *Involvement of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in attenuation of radiation-induced hyperthermia by interleukin 1 alpha in rats*, Brain res., 1993, 606, 106-10).

- Dans la protection contre les effets induits par les rayons ultraviolets, par exemple sur la rétine. (Oguni et coll., *Chronical retinal effects by ultraviolet irradiation with special référence to superoxide dismutase*, Histol. Histopathol, 1996, 11, 695-702), et le traitement des Uvéïtes (Koch et coll., *Effects of different antioxidants on lens-induced uveitis*, Ger. J. Ophthalmol., 1996 5; 1185-8). Le traitement par le RGTA peut être envisagé seul ou en association avec la SOD et son utilisation peut être aussi bien médicale que cosmétologique.

- Dans le traitement de l'hypertension. En effet, l'activité de la SOD endogène est diminuée chez les sujets hypertendus (Jun Ke yan et Catalano, *Increase superoxide anion production in humans, a possible mechanism for the pathogenesis of hypertension*, J. Hum. Hypertens, 1996, 10, 305-309). Un apport de RGTA aura pour effet d'augmenter cette activité et de réduire l'hypertension.

- Dans le traitement des maladies inflammatoires comme l'arthrite.

Les RGTA sont utiles également pour la conservation des organes ou tissus ainsi que dans le maintien des fluides biologiques ce qui permet d'envisager les applications suivantes :

- Dans les fluides biologiques comme le sang et ses constituants cellulaires, par exemple en hémodialyse.

- Pour la préservation des organes, dans le cas de greffes ou de traitements ex vivo ou en

reperfusion (Razak et col., *Crosslinked hemoglobine-superoxide dismutase-catalase scavenges free radicals in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury*, Artif. cells Blood substiti immobil. Biotechnol. 1997, 25, 181-192). L'addition de RGTA à des solutions de conservation d'organes et administrés en reperfusion permet une préservation de ces organes.

5 L'invention concerne des compositions pharmaceutiques comprenant au moins un polymère défini précédemment et destiné au traitement et/ou à la
10 prévention des lésions et souffrances tissulaires, telles que celles rencontrées en traumatologie, nécessitant des chirurgies réparatrices ou plastiques des planchers cutanés ou plus profonds comme ceux des muscles, des os, du cerveau, du coeur, des viscères,
15 etc..., dans les maladies dégénératives associées ou non à des fibroses, dans les pertes de masse tissulaire comme l'ostéoporose ou les myopathies, dans les domaines cardio vasculaires, neurologiques, en dermatologie, etc....

15 Une propriété remarquable des RGTA est leur capacité à se fixer sur les tissus lésés, ce qui permet d'utiliser les RGTA comme vecteur de ciblage dans un objectif thérapeutique et/ou de diagnostic. En
20 conséquence, les polymères de l'invention peuvent être couplés à des molécules, représentées précédemment par le groupement Z, douées d'activités thérapeutiques ou à des molécules permettant de faciliter le repérage du tissu lésé.

25 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent concernant d'une part la préparation de polymères de l'invention dont le squelette polymérique est de type

polyester ou de nature polysaccharidique, et d'autre part, les propriétés des polymères de l'invention.

A) PRÉPARATION DES POLYMÈRES DE L'INVENTION.

5

EXEMPLE 1 : Synthèse de dérivés de poly (acide - β - malique) à partir d'un squelette non polysaccharidique.

10

Dans cet exemple, le polymère de l'invention est un copolymère d'acides - β - malique de formule générale (II) dont les motifs A, substitués par X et/ou Y et/ou Z sont représentés à la figure 1. Dans la figure 1 :

15

A est $-(O-CH_2-CH_2-CO)-$

X est $-COOH$ ou $-COO^-Na^+$

Y est $-CO-CH_2-CHOH-CH_2-SO_3H$ ou $-CO-CH_2-CHOH-CH_2-SO_3^-Na^+$

Z est $-CO-OCH_3-CH(CH_2-CH_3)-CH_3$

20

x, y et z, correspondant aux pourcentages des groupements X, Y et Z, indiqués dans le tableau I ci-dessous en fonction des différents polymères synthétisés.

Tableau I

25

| Référence | Type de polymère | Groupements carboxyliques = X | Groupements Soufrés = Y | Groupements hydrophobes = Z |
|-----------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| RGTA 2010 | P _{COO} ⁻ | 100% | 0% | 0% |
| RGTA 2011 | P1S | 60% | 10% | 10% |
| RGTA 2012 | P2S | 75% | 11% | 12% |

P_{COO}⁻ correspond à un polymère ne comportant exclusivement que des groupements X carboxyliques ou carboxylates.

P1S et P2S correspondent à des polymères comportant en plus des groupements X, des groupements Y sulfonates et des groupements hydrophobes butyles Z .

5 La synthèse de ce polymère passe par la préparation de β -lactones β -substituées et est suivie d'une polymérisation anionique par ouverture de cycle. Les trois β -lactones synthétisées sont représentées à la figure 2 en annexe.

10 Les monomères sont obtenus à partir de l'acide DL-aspartique en quatre étapes avant la polymérisation comme montré à la figure 3 en annexe.

La synthèse du malolactonate d'alkyle se fait à partir de l'acide DL-aspartique où R représente
15 -CH₂-C₆H₅ (malolactonate de benzyle) ou -CH(CH₃)-CH₂-CH₃ (malolactonate de 2-butyle) ou encore -CH₂-CH=CH₂ (malolactonate d'allyle).

I - Synthèse des monomères (voies de l'acide aspartique).
20

1) Synthèse de l'acide (2R,S) 2-bromosuccinique.

La synthèse de l'acide (2R,S) bromosuccinique est obtenue après une réaction de
25 diazotation de l'acide DL-aspartique. Pour cette réaction, le carbone portant le groupement amine subit une double inversion de configuration (Guérin et coll., Optically active poly(β -malic acid), 1985, Polymer Bulletin, 14: 187).

30 100 g (0,75 moles) d'acide DL-aspartique et 415 g (4,04 moles; 5,5 éq.) de bromure de sodium sont dissous dans 1620 millilitres d'acide sulfurique 2N dans un bain de glace. 62 g (0,9 moles; 1,2 éq.) de nitrite de sodium sont additionnés par petites quantités, sous
35 agitation. 30 minutes après la fin de cette addition, le milieu réactionnel est neutralisé par 8 g (0,13 moles;

0,18 éq.) d'urée pendant 30 minutes à température ambiante. L'acide bromosuccinique est extrait par 1 litre d'acétate d'éthyle et la phase aqueuse est lavée avec 1 litre d'acétate d'éthyle. Les phases organiques
5 sont séchées sur sulfate de magnésium, filtrées sur büchner puis l'acétate d'éthyle est éliminé au rotavapor.

L'acide bromosuccinique est alors recristallisé 4 fois dans l'acétonitrile, filtré sur
10 büchner puis séché 4 h à 45°C sous vide dans un dessiccateur.

Caractéristiques : PM = 197; m = 52,8 g; Rendement de 36%; Tf=168°C; Aspect : poudre blanche

15 2) Synthèse des monoesters.

La synthèse des monoesters passe par la préparation préalable de l'anhydride sans racémisation des centres chiraux. L'anhydride est synthétisé à partir de l'acide (2R,S) 2-bromosuccinique sous l'action d'un
20 agent déshydratant, l'anhydride trifluoroacétique (TFAA) en conditions anhydres et sous azote. L'étape suivante est l'ouverture de l'anhydride par un alcool qui conduit à 2 monoesters dont un seul sera lactonisable. Le choix de l'alcool est fait selon la nature de la lactone
25 souhaitée.

a) Synthèse du bromosuccinate de benzyle.

50 g (0,25 moles) d'acide bromosuccinique sont dégazés sous courant d'azote pendant 2 h. Dans un
30 bain de glace, 125 millilitres de tétrahydrofurane (THF) anhydre puis 43,4 millilitres (0,30 moles; 1,2 éq.) d'anhydride trifluoroacétique (TFAA) sont ajoutés goutte à goutte par une ampoule à brome. La solution est laissée 2 h à température ambiante sous agitation, puis
35 le THF, le TFA formé et le TFAA en excès sont éliminés

au rotavapor. L'anhydride bromosuccinique obtenu est mis à dégazer 2 h.

27,7 millilitres (0,25 moles; 1 éq.) d'alcool benzylique sont ensuite ajoutés. La solution est agitée à 40°C sous atmosphère inerte pendant 12 h. Le mélange de monoesters ainsi obtenus est dissout dans 150 millilitres d'éther. La phase étherée est lavée 3 fois avec 100 millilitres d'eau, séchée sur sulfate de magnésium et filtrée sur büchner.

Caractéristiques : PM = 287; m = 71,3 g; Rendement de 95%; Aspect : huile jaune pâle

b) Synthèse du bromosuccinate d'allyle.

Le même protocole que précédemment est mis en oeuvre, mais 17,86 millilitres (0,25 moles; 1 éq.) d'alcool allylique sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 22 h à 60°C sous atmosphère inerte au lieu de 12 h à 40°C. Les monoesters sont purifiés de façon identique.

Caractéristiques : PM = 237; m = 17,6 g; Rendement de 72,8%; Aspect : huile visqueuse

c) Synthèse du bromosuccinate de 2-butyle.

Même protocole que ci-dessus en 2)b) mais avec 18,8 g (1 éq.) de (RS)-2-butanol préalablement distillé. Le milieu réactionnel est agité pendant 12 heures à 60°C sous atmosphère inerte.

Caractéristiques : PM = 253; m = 45 g; Rendement de 90%; Aspect : huile jaune orangée

3) Synthèse des lactones.

La réaction de lactonisation a lieu sur le seul monoester lactonisable et présente une inversion de configuration. Elle est effectuée directement sur le mélange de monoesters après neutralisation à pH 7,2 par de la soude 2N. La réaction a lieu dans un milieu

biphasique dichlorométhane/eau. La lactone est purifiée par chromatographie sur colonne de silice. La nature de l'éluant est différent selon la nature de la lactone. Cette lactone est ensuite distillée sur une colonne appropriée.

a) Synthèse du malolactonate de benzyle.

71 g (dont 70% de monoester lactonisable soit 0,173 moles) de mélange de monoesters sont dissous dans 300 millilitres d'éther et 250 millilitres d'eau dans un ballon. Une solution d'hydroxyde de sodium 2N est ajoutée goutte à goutte jusqu'à pH 7,2, puis 450 millilitres de dichlorométhane sont additionnés. Le ballon est surmonté d'un système réfrigérant et le système biphasique est fortement agité pendant 3 h à 40°C.

Après décantation, la phase organique est lavée 2 fois avec 250 millilitres d'eau puis 2 fois avec 250 millilitres de saumure, séchée sur sulfate de magnésium et filtrée. Le solvant est éliminé au rotavapor. Cette lactone est purifiée sur colonne de silice (éluant : dichlorométhane/éther de pétrole 8/2) et distillée 3 fois sous vide.

Caractéristiques : PM=206; m=20,7 g avant purification soit un rdt =40,5%; m=3,41 g après purification soit un rdt=6,7%; Te=116-118°C sous $3 \cdot 10^{-2}$ mbars; IR (n , cm^{-1}): $n(\text{COlactone})=1825\text{cm}^{-1}$; $n(\text{COester})=1740\text{cm}^{-1}$; Aspect : huile incolore.

b) Synthèse du malolactonate d'allyle.

Selon le même protocole que ci-dessus en 3)a) mais le pH de la phase aqueuse est de 7,8 au lieu de 7,2 et la solution est agitée 5 h au lieu de 3 h. La lactone est purifiée sur colonne de silice (éluant : éther de pétrole/éther éthylique 4/6) et est distillée 3 fois sous vide.

Caractéristiques : PM = 156 m = 15,3 g avant
purification soit un rendement de 53,4%; m=4 g après
purification soit un rdt=13%; Te = 62-65°C sous 3.10^{-2}
mbars; IR (n, cm^{-1}): n(CO lactone)=1825 cm^{-1} ; n(CO ester)
5 = 1740 cm^{-1} ; Aspect : liquide incolore.

c) Synthèse du malolactonate de 2-butyle.

Selon le même protocole que ci-dessus en
3)a). La lactone est purifiée sur colonne de silice
10 (éluant : dichlorométhane/éther de pétrole 8/2) et est
distillée 3 fois sous vide.

Caractéristiques : PM = 172; m = 26,7 g
avant purification soit un Rendement de 55%; m = 14,4 g
après purification soit un Rendement de 28%; Te = 80-
15 82°C sous 3.10^{-2} mbars; IR(n, cm^{-1}): n(CO
lactone)=1825 cm^{-1} ; n(CO ester)= 1740 cm^{-1} ; Aspect : huile
visqueuse incolore.

II - Synthèse des polymères.

20

Les lactones ont été polymérisées en
présence de benzoate de tétraméthyl ammonium (10-3 éq.)
à 37°C pendant 15 jours. Le suivi de la polymérisation a
été fait par analyse infrarouge en observant la
25 disparition de la bande lactonique à 1850 cm^{-1} .

1) Synthèse du poly(malate de benzyle-co-
malate de butyle-co-malate d'allyle).

5 g (24,2 mmoles) de malolactonate de
30 benzyle, 1,4 g (9,3 mmoles) de malolactonate d'allyle et
0,7 g (4,1 mmoles) de malolactonate de butyle sont
dégazés pendant 2 h et transférés par canule dans un
ballon contenant 471 millilitres d'une solution
d'amorceur (benzoate de tétraéthylammonium:10 $^{-3}$ éq.;
35 37,72.10 $^{-6}$ moles) à 80.10 $^{-3}$ M, préalablement dégazée 2 h
sous courant d'azote. La copolymérisation est conduite à

37°C pendant 15 jours sous atmosphère inerte et sous agitation. Le polymère est alors dissous dans un minimum de chloroforme. Les chaînes sont terminées par addition d'une goutte d'acide chlorhydrique concentré et le polymère est précipité à l'éthanol puis séché sous vide à 40°C pendant 48h.

Caractéristiques : m = 4,37 g ; Rendement de 61,5% ; Tv = -5°C ; IR (n, cm-1) : n (C=O)=1748 cm-1 ; SEC (THF, standards polystyrène) : Mn = 6600 ; Mw = 9200 ; Ip = 1,4 ; MSEC = 10000 ; S 134 (CH=) ; 168 (C=O chaîne latérale) ; 170 C=O chaîne principale) ; Aspect : polymère vitreux transparent

2) Epoxydation du poly(malate de benzyle-co-malate de butyle-co-malate d'allyle).

1,12 g (7,91 mmoles d'unités insaturées) de polymère sont dissous dans 3 millilitres de dichlorométhane anhydre dans un ballon. Une solution contenant 466,34 milligrammes (4,69 mmoles ; 6 éq.) d'acide métachloroperbenzoïque (MCPBA) dans 2 millilitres de dichlorométhane est ajoutée par canule. Le mélange est agité 24 heures à température ambiante, puis est filtré. Le polymère est alors précipité à l'éthanol et séché dans un dessiccateur sous vide.

Caractéristiques : m = 4 g ; Rendement de précipitation de 92% ; Rendement de la réaction d'époxydation = 100% ;

La masse molaire ne varie pas lors de l'époxydation car le MCPBA n'induit pas une modification de la longueur de la chaîne.

3) Hydrogénolyse du poly(malate de benzyle-co-malate de butyle-co-malate d'allyle).

4 g du polymère sont dissous dans 5 millilitres de dioxanne fraîchement distillé sur sodium dans un ballon. 800 milligrammes (20% en poids) de

palladium sur charbon actif sont ajoutés et l'hydrogénolyse est mise en route. Quand le volume d'hydrogène consommé n'augmente plus (24 h après le début de la réaction), l'hydrogénolyse est arrêtée. La solution est filtrée sur célite et le dioxanne est éliminé au rotavapor.

Caractéristiques : m = 2 g; Rendement d'hydrogénolyse de 100%;

4) Sulfonation du poly(malate de benzyle-co-malate de butyle-co-malate d'allyle).

4 g de polymère (soit $5,64 \cdot 10^{-3}$ moles d'époxyde) sont dissous dans 20 millilitres d'eau. 2,14 g de bisulfite de sodium (2 éq., $11,28 \cdot 10^{-3}$ moles) sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à 7,4 (Housse-Ferrari, "Préparation et caractérisation de silices poreuses modifiées par des polymères et des copolymères de N,N' diméthylacrymide", Thèse de l'université Paris VI, 30 janvier 1990). La solution est laissée sous agitation pendant 7 h dans la glace puis est ultrafiltrée 24 h à 4°C contre de l'eau et lyophilisée.

La figure 4 en annexe récapitule les étapes de synthèse des dérivés du poly(acide - β - malique).

EXEMPLE 2 : Synthèse de polymères polysaccharidiques constitués de motifs de glucoses substitués.

I - Synthèse de Carboxyméthylesulfates de Dextran désignés CMDS.

Dans cet exemple, le polymère de l'invention est constitué de dextrane substitué dont les motifs de glucose A substitués par X et/ou Y et où Z est rien sont représentés dans la figure 5 en annexe. Les différents

types de greffage sont représentés à la figure 5, dans laquelle :

A est un monomère de glucose sur lequel les X, Y et Z sont greffés par l'intermédiaire des fonctions hydroxyles en position 2 et/ou position 3 et/ou position 4 et/ou par l'intermédiaire des groupements X pour Y et/ou Z, et/ou par l'intermédiaire des groupements Y pour Z,

X est $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ou $-\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$

Y est $-\text{SO}_3\text{H}$ ou SO_3^-Na^+

Z est un groupement variable dont quelques exemples sont rapportés plus loin.

Les polymères de type CMDS dans lesquels Z = rien contiennent plusieurs types de monomères. Les premiers types de monomères substitués sont des carboxyméthyl glucose de type A-X substitués en position 2 et/ou 3 et/ou 4 (motifs présentés figure 5). L'addition du groupement Y = (motifs A-Y représentés à la figure 5) correspond à une O-sulfatation et devient, avec R = rien et $\text{R}' = \text{H}^+$ ou Na^+ , $\text{Y} = \text{O}-\text{SO}_3^- \text{H}^+/\text{Na}^+$. Si Y est fixé sur X, R de Y devient CH_2-CO et la fonctionnalité de X (COO^-) perdue, n'est plus considérée comme existant. Elle devient alors partie de Y et rentre dans la mesure des pourcentages de substitution des groupements actifs Y.

Les différents monomères constituant le polymère CMDS sont donc soit du glucose non substitué, soit du carboxyméthyl glucose soit du glucose sulfate soit du carboxyméthyl glucose sulfate. Les différentes formes isomériques sont schématisées figure 5. Les polymères correspondent donc à toutes les combinaisons possibles de ces différentes formes monomériques et se définissent par les taux résiduels de groupements X et Y libres.

Les monomères ainsi obtenus sont soit du glucose sulfate en position 2, 3 et/ou 4 et/ou du carboxyméthyl glucose sulfate. Le sulfate est fixé soit sur le glucose soit sur le groupe carboxylique.

5 Ainsi, dans la figure 5, dans laquelle les liaisons des groupements schématisés par un pointillé représentent des monomères où toutes les combinaisons circulaires peuvent être envisagées.

10 1) Synthèse de dextrane carboxyméthyl sulfate désigné CM_nDS_m .

 a) Carboxyméthylation.

 La première étape de carboxyméthylation du dextran est réalisée selon le protocole décrit dans
15 Mauzac et collaborateurs (Mauzac et coll., Anticoagulant activities of dextran derivatives Part I : Synthesis and characterization, 1984, Biomaterials 6/61-63). Il s'agit d'une étherification des fonctions hydroxyles des
résidus glucose du dextran en vue de l'obtention d'un
20 carboxyméthyldextran. Cette réaction peut être reproduite plusieurs fois et conduit à des produits dénommés CM_nD où n représente le nombre d'étapes de carboxyméthylation. Les différents produits appelés CM_nD se caractérisent par un % de COOH croissant. Ce procédé
25 permet donc d'obtenir différents taux de carboxyméthylation du dextrane comme indiqué dans le tableau de la figure 6.

 Ainsi, dans un ballon réfrigéré de 250 millilitres, du Dextran T40 (37,37 g, $9,34 \cdot 10^{-4}$ mol),
30 provenant de la société Sigma et de poids moléculaire 40 000 D, est solubilisé (182 millilitres d'eau distillée) à 4°C. Une solution de soude (74 g, 1,85 mol dans 124 millilitres d'eau distillée), également refroidie à 4°C, est versée lentement dans la solution de Dextran tout en
35 maintenant la température de 4°C constante. De l'acide monochloroacétique (76,2 g, 0,806 mol) réduit en fine

poudre, est additionné lentement en maintenant la même température de réaction. Cependant la température du milieu s'élève en fin de réaction de 4°C à 21°C en quelques minutes. Le mélange est ensuite amené à 50°C dans un bain d'huile thermostaté pendant 40 mn. Pendant le chauffage, le milieu réactionnel acquiert une coloration jaune. Après refroidissement, le pH est neutralisé à 7,2 avec de l'acide acétique glacial. (Takakura, 1990). Le carboxyméthyl-dextran est recueilli par précipitation dans de l'éthanol absolu froid (5 à 6 fois le volume réactionnel). Il est, ensuite, séché dans une étuve à vide. Le polymère CM₁D est purifié par ultrafiltration puis lyophilisé (masse = 56 g brut).

La présence des ions carboxyliques est quantifiée par dosage acido-basique en retour avec l'utilisation de l'acide nitrique. La base utilisée est la soude 1 N. Le résultat s'exprime en % de groupements COOH. % COOH du CM₁D = 48,98 %

Ce pourcentage signifie que statistiquement environ une unité glucose sur deux a été carboxyméthylée.

En pratique, cette réaction peut être réalisée plusieurs fois pour atteindre les taux de substitution souhaités. Ainsi, le même protocole a été appliqué pour la synthèse d'un CM₂D à partir du CM₁D et d'un CM₃D à partir du CM₂D :

% COOH du CM₂D = 91,8 % et % COOH du CM₃D = 118,3 %.

b) Sulfatation.

La réaction de sulfatation des fonctions hydroxyles résiduelles après les étapes de carboxyméthylation est effectuée avec de l'acide chlorosulfonique. Elle aboutit à des composés dénommés CM_nDS_m donnés dans le tableau de la figure 6 en annexe, où m correspond à des équivalents d'acide

chlorosulfonique tels que définis dans l'exemple ci-dessous.

Exemple de sulfatation du CM₁D :

5 500 milligrammes (PM=7,8 mmol/g) du
carboxyméthyl₁dextran (CM₁D) sont dispersés dans 40
millilitres de dichlorométhane sec). Le nombre de
résidus hydroxyles restés libres et susceptibles de
réagir dans une réaction de sulfatation est de $n_{OH} = 4 \cdot 10^{-3}$ mole. La réaction a été réalisée en présence d'un
10 équivalent d'acide chlorosulfonique ($n_{ClSO_3H} = 4 \cdot 10^{-3}$
mole) soit approximativement = 0,5g ou un volume de 0,3
millilitres, la densité de la solution d'acide
chlorosulfonique étant de 1,75). Les 0,3 millilitres
d'acide chlorosulfonique sont dilués dans 4 millilitres
15 de dichlorométhane déshydraté. Le CM₁DS₁ ainsi obtenu
est récupéré par filtration du milieu réactionnel sous
vide sur fritté.

La même réaction peut être réalisée en
présence de 0,5 ou 1,5 ou 2 ou 3 équivalents d'acide
20 chlorosulfonique ou d'un excès de façon à greffer des
quantités croissantes de groupements O-sulfates. Les
polymères RGTA ainsi obtenus sont appelés CM_nDS_m, avec n
= 1, 2, etc... et $m = 0.5, 1, 2, \text{etc....}$

Sur le même principe et en vue de comparer
25 ces polymères à d'autres molécules sulfatées, nous avons
considéré comme produits de comparaison avec les CM_nDS_m
soit des dextrans sulfatés du commerce (produit
Pharmacia Biotech, code 17-0270-01), soit des dextrans
sulfatés à partir de dextran T40 en présence de m
30 équivalents d'acide chlorosulfonique, c'est à dire dans
des conditions réactionnelles comparables à celles
permettant d'obtenir les CM_nDS_m.

Les résultats de différents dosages des
groupements X par titration et Y par analyse élémentaire
35 du taux d'atome de soufre permettent de préciser les
valeurs correspondantes x et y pour chacun des composés

synthétisés CM_nDS_m . L'ensemble de ces données est rapporté dans le tableau de la figure 6 en annexe. Cette figure précise par ailleurs ces pourcentages pour du sulfate de dextrane commercial et pour des dextrans sulfatés dans les mêmes conditions que les CM_nDS_m .

2) Synthèse des polymères de dextran carboxyméthyle-phényl sulfonate noté CM_2DPhS et d'un dérivé Dextran carboxyméthyl sulfate phényl sulfonate désigné CM_2DPhSS .

Ces polymères sont constitués d'un enchaînement de motifs représentés à la figure 7 en annexe, et correspondent à ceux de la figure 4 ou 2 n'était rien. Ces polymères sont constitués d'un enchaînement de motifs de type A-X, A-Y et A-Z tels que représentés à la figure 6.

Dans cet exemple, le groupement Z est du phényl sulfonate noté PhS. La figure 7 représente un monomère A-Z dans le cas où Z a été additionné sur un radical carboxyl greffé en position 2 du glucose d'origine, lui même sulfaté en position 3 et 4.

Le polymère CM_2D (2 g; 3,90 mmol) est dissous dans 13 millilitres d'eau distillée. Le pH de la solution est ajusté à 3,5 avec de l'HCl 3 M. L'agent couplant EEDQ (1,93 g, 2 équ.) est dissous dans 16 millilitres d'éthanol (0,12 g d'EEDQ/ millilitre) à 40°C. La solution d'EEDQ est ajoutée progressivement au polymère et le mélange réactionnel est agité fortement pendant 30 min. Le sel d'acide phénylsulfanilique (NH_2PhSO_3Na , 3,045 g, 2équ.) est ensuite ajouté par petites quantités. Le pH de la réaction est ajusté à 9 avec de la soude. Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures, puis neutralisé avec HCl dilué. Le produit CM_2DPhS est alors ultrafiltré, évaporé sous vide puis lyophilisé (1,66 g).

Les analyses élémentaires et acide-bas du CM₂DPhS donnent : % C = 33,9; % H = 5,28; % N = 0,3; % S = 0,67; % COOH = 81 %

5 Les analyses élémentaires et titrimétriques acide-base du polymère CM₂DPhSS*₁ donnent % C = 23,16; % H = 3,72; % N = 0,27; % S = 9,60; % COOH = 52 %

3) Synthèse d'un dérivé Carboxymethyl Dextran N et O Sulfaté.

10 Ces polymères sont constitués d'un enchainement de motifs de type A-X, A-Y et A-Z tels que représentés à la figure 6, dans lesquels un des motifs caractéristiques A-Z est présenté à la figure 8 en annexe. Dans cet exemple le groupement Z qui est de
15 l'éthylènediamine noté DE est greffé sur le radical carboxyl du carbone 2 du monomère glucose d'origine, lui-même sulfaté en position 3 et 4.

Le même protocole que précédemment a été appliqué sur le CM₂D avec dans un premier temps,
20 l'addition d'un groupement Z d'éthylènediamine noté DE pour aboutir au produit désigné CM₂DE.

Les analyses élémentaires et titrimétriques acide-base du polymère CM₂DE donnent : % C = 37,67; % H = 6,25; % N = 5,35; % COOH = 19 %.

25 Le protocole de sulfatation a été réalisé sur une fraction de ce polymère en utilisant 1 équivalent d'acide chlorosulfonique. Les produits obtenus correspondent à du CM₂DES₁ représenté à la figure 7 en annexe. Dans ce cas, selon la formule
30 générale des RGTA, Z est du diéthylamine.

Les analyses élémentaires et titrimétriques acide-base du polymère CM₂DDES₁ donnent : % C = 36,83; % H = 5,82; % N = 4,67; % S = 1,82; % COOH = 10,7 %

35 Ces synthèses permettent de greffer des groupements N-sulfate en plus des groupements O-sulfate des CMDS. Ces différents polymères permettent

d'apprécier les rôles spécifiques des groupements N-sulfate et O-sulfate des CM₂DES par rapport aux groupements phényl sulfonate notés PhS des composés CM₂DPhS, aux composés sulfatés et sulfonates des CM₂DPhSS ou aux composés. Dans ce type de polymères, il apparaît que les groupements sulfates sont essentiellement liés aux propriétés des RGTA.

4) Synthèse des polymères de dextran carboxyméthyle-phénylalanine sulfate désigné CM₃DPhS et de dextran carboxyméthyle tyrosine sulfate désigné CM₃DTyrS représentés à la figure 9 en annexe.

Ces polymères sont constitués d'un enchainement de motifs de type A-X, A-Y et A-Z tels que représentés à la figure 6 dans lesquels les motifs caractéristiques sont représentés à la figure 9 en annexe. Dans cet exemple, les groupements Z sont respectivement soit de la phénylalanine pour Phe soit de la tyrosine pour Tyr. Ils ont été additionnés sur un radical carboxyl greffé en position 2 du glucose d'origine lui même sulfaté en position 3 et 4.

Dans ces polymères, Z est un acide aminé avec soit de la phénylalanine (Phe) ou de la tyrosine (Tyr) et Y est un groupe -OSO₃⁻.

Ces synthèses ont été réalisées pour apprécier l'importance des structures aromatiques de ces deux acides aminés Phe et Tyr en remplacement de la benzylamine notée B telle que connue dans le CMDBS de l'art antérieur, mais dont le relarguage dans les applications *in vivo* peut être préjudiciable en générant des risques de tumorigénicité.

Le polymère CM₃D (% COOH = 136 %, 0,6 g, 3,014 mmol) est dissous dans 6 millilitres d'eau distillée. Le pH de la solution est ajusté à 3,5 avec HCl 3M. l'agent couplant EEDQ (745 milligrammes, 1 équivalent), est dissous dans 6,2 millilitres d'éthanol à

40°C. La solution d'EEDQ est ajoutée au polymère goutte à goutte et le mélange réactionnel est agité vigoureusement pendant 30 min. à température ambiante. La phénylalanine méthylester (1,3 g, 2 équ.) est ajouté
5 très lentement au mélange et le pH est ramené de 5 à 9 avec de la soude. La réaction est maintenue à température ambiante pendant 4 heures. La solution est ensuite neutralisée avec HCl dilué. Le polymère CM₃DPhe est alors ultrafiltré, évaporé sous vide puis lyophilisé
10 (524 milligrammes).

Les analyses élémentaires et titrimétriques acide-base du polymère CM₃DPhe donnent : % C = 36,9; % H = 5,03; % N = 0,44; % COOH = 101,05 %.

Le même protocole a été réalisé sur le CM₃D avec la tyrosine méthylester CM₃DTyr.
15

Les analyses élémentaires et titrimétriques acide-base du polymère CM₃DTyr donnent : % C = 34,41; % H = 5,12; % N = 0,28; % COOH = 101,76 %.

Le protocole de sulfatation a été réalisé sur ces deux polymères en utilisant 2 équivalents d'acide chlorosulfonique.
20

Les analyses élémentaires et titrimétriques acide-base du polymère CM₃DPheS*₂ donnent : % C = 18,08; % H = 2,89; % N = 0,30; % S = 14,71; % COOH = 28,79 %.

Les analyses élémentaires et titrimétriques acide-base du polymère CM₃DTyrS₂ donnent : % C = 17,99; % H = 3,13; % N = 0,3; % S = 14,35; % COOH = 19,85 %.
25

5) Synthèse des polymères lipidiques : exemple avec le dextran carboxyméthyle - acide oléique Sulfaté (CM₁DoléicS) et le dextran carboxyméthyle - acide palmitique Sulfaté (CM₁DpalmS) représentés à la figure 10 en annexe.
30

Ces polymères sont constitués d'un enchainement de motifs de type A-X, A-Y et A-Z tels que représentés à la figure 6 dans lesquels les motifs
35

caractéristiques sont représentés à la figure 10 en annexe. Dans cet exemple, les groupements Z qui sont respectivement soit de l'acide oléique pour oléic soit de l'acide palmitique pour palm ont été additionnés sur l'hydroxyle du carbone 3 d'un carboxyméthyl glucose en position 2 sulfaté en position 4.

Ces composés répondent à la formule (I) dans laquelle $Y = -OSO_3^-$ et Z est de l'acide oléique ou palmitique. Ces acides gras ont été greffés pour apprécier l'importance de la balance hydrophobicité / hydrophilie des polymères en plus du rôle propre de ces acides gras.

Au polymère CM₁D (1 g, 2,43 mmol) dissous dans du DMSO (16 millilitres) est ajouté de la triéthylamine (0,8 millilitres) et goutte à goutte du chlorure oléique (1,6 millilitres). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le polymère est précipité dans 120 millilitres d'acétate d'éthyle, centrifugé puis séché sous vide. Le précipité est dissous dans 20 millilitres d'acétate de sodium 2M et le sel formé est précipité dans l'éthanol (160 millilitres), filtré, dissous dans 20 millilitres d'eau distillée puis enfin dialysé contre l'eau. Après dialyse (24 h.), la solution évaporée sous vide fournit le dextran lipidique CM₁Doléic (751 milligrammes).

Analyses élémentaires du produit CM₁Doléic :
% C = 34,25 et % H = 5,91

Le même protocole a été réalisé avec le chlorure palmitique polymère CM₁Dpalm.

Les analyses élémentaires du polymère CM₁Dpalm donnent : % C = 35,13, % H = 5,96

Le protocole de sulfatation a été réalisé sur ces deux polymères en utilisant 1 équivalent d'acide chlorosulfonique.

Les analyses élémentaires du polymère CM₁DoléicS*₁ donnent : % C = 28,28; % H = 5,04; % S = 5,26.

Analyses élémentaires du produit CM₁DpalmS*₁ donnent : % C = 29,17 % ;H = 4,88; % S = 5,14.

Les différents exemples évoqués selon le greffage d'un groupement Z aboutissent à des composés dont la définition de quelques uns d'entre eux sont présentées dans le tableau II ci dessous.

Tableau II

| Référence | Groupements | X | Y | Z |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|
| RGTA 1110 | CM ₂ DPhSS1 | 52,1 | 43,8 | 8,9 |
| RGTA 1111 | CM ₂ DES ₁ | 10,7 | 42,4 | 21,2 |
| RGTA 1112 | CM ₂ DPheS2 | 28,9 | 56,2 | 17,9 |
| RGTA 1113 | CM ₃ DTyrS2 | 19,8 | 65,9 | 28,9 |
| RGTA 1114 | CM ₁ DPalmS1 | 39,8 | 47,5 | 3,8 |
| RGTA 1115 | CM ₁ DOLéiS1 | 36,0 | 43,9 | 2,2 |

Le tableau II ci-dessus indique les pourcentages de substitution des polymères comportant un groupement Z.

6) Etapas de purification des différents dérivés de dextrans des exemples ci-dessus.

a) Dialyse à l'équilibre.

A la suite de chaque étape de synthèse les polymères sont recueillis sous forme solide (précipitation ou filtration suivie d'une lyophilisation). Les polymères sont ensuite resolubilisés dans le volume minimum d'eau distillée puis introduits dans un boudin de dialyse (Spectrapor) de seuil de coupure 6000 à 8000 g.mol⁻¹. La dialyse est effectuée contre de l'eau bidistillée (MilliQ) dans un rapport de 1 volume de produit pour 50 volumes d'eau

pendant 4 à 5 jours avec deux changements d'eau par jour.

b) Chromatographie.

5 A l'étape précédente est associée un chromatographie HPLC sur tamis moléculaire (Colonne TSK) de façon à établir la masse molaire des polymères purifiés.

10 c) Ultrafiltration tangentielle.

Après la dialyse, le contenu des boudins est ultrafiltré dans une cellule d'ultrafiltration (Pellikon, Millipore) sur une membrane de cellulose de seuil de coupure 10000 g.mol⁻¹. La qualité de la
15 purification est suivie à l'aide d'une cellule de conductimétrie. Lorsqu' en sortie de cellule, la conductivité de l'eau éliminée est revenue à la conductivité de l'eau distillée pure (2μS), la purification est arrêtée et la solution est concentrée
20 avant lyophilisation.

7) Détermination des pourcentages de substitution.

25 Dans les deux groupes d'exemples détaillés ci-dessus, les pourcentages de substitution des groupements X, Y et éventuellement Z sont établis de la façon suivante.

30 a) Polymères poly acide - β - malique (Exemples 1).

Pour ces polymères, les pourcentages de substitution sont définis a priori en fonction de la proportion des différents monoesters mis à polymériser.

35

b) Polymères de dextrane (Exemples 2).

Deux cas doivent être envisagés pour ces polymères obtenus à partir du dextrane selon la définition du groupe Z.

5 Le premier correspond au cas des CM_nDS_m où Z = rien et le second, dépend de la nature chimique de Z.

10 Sur chaque résidu glucose, 3 fonctions hydroxyles sont susceptibles de réagir. Une masse molaire relative de 54 g.mol^{-1} est attribuée à chaque fonction hydroxyle, soit le tiers de la masse moléculaire de 162 g.mol^{-1} d'un résidu constitutif du dextran. Il est admis que chaque hydroxyle possède la même réactivité et que les substitutions affectent d'abord une fois chaque unité glucose avant une
15 éventuelle seconde substitution sur le même résidu.

Un dextran T 40 de $40\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ contient donc 247 résidus glucose de masse molaire 162 g.mol^{-1} .

20 Les taux de substitutions atteints lors des carboxyméthylations sont déterminés par dosage acide-base avec un titrimètre automatique (Tacussel). Ce dosage détermine une valeur X_1 correspondant au nombre de moles d'acide fixées par gramme de polymère.

25 Ainsi, lorsqu'un hydroxyle est substitué, il apparaît sur le glucose un motif : $-OCH_2COONa$. Chacune de ces sous unités substituées a une masse moléculaire relative de 240 g.mol^{-1} .

Après la sulfatation, il apparaît plusieurs motifs.

30 Les taux de groupements carboxyliques libres déterminés par dosage acide base donnent une valeur X_2 toujours inférieure à la valeur initiale X_1 . La différence $X_1 - X_2$ correspond à des motifs $-OCH_2COO-SO_3Na$. Chacune de ces sous unités substituées a une masse moléculaire de 320 g.mol^{-1} .

35 L'analyse par RMN permet de montrer que le S correspond à une sulfatation des hydroxyles libres des

résidus glucose en plus de la réaction précédente. Dans ce cas, il apparait un motif $-\text{OSO}_3\text{Na}$. Chacune de ces sous unités de glucose sulfaté a une masse moléculaire relative de 200 g.mol^{-1} . Les microanalyses donnent le

5 taux de S en pourcentage de la masse du polymère.

Il est ainsi possible, en fin de synthèse, en connaissant les pourcentages de radicaux carboxyles libres X_1 et X_2 déterminés respectivement avant et après l'étape de sulfatation, de considérer que le polymère

10 contient :

- a résidus glucose non substitué de masse 162 g.

- X_2 résidus carboxyliques libres de masse 240 g.

15 - X_1-X_2 résidus carboxyliques sulfatés de masse 320 g.

- Y résidus glucose sulfatés de masse 200 g.

A partir de ces données il est possible d'établir le pourcentage de substitution des groupements X et Y.

20

Ainsi, le pourcentage de soufre donné par les résultats de microanalyse (S%) permet de connaître le nombre d'atomes de soufre (Σ_S) greffés sur le polymère. Ce nombre d'atomes est de $\Sigma_S = (\text{S\%} \times \text{MM}) / 32 \times 100$, où

25 32 est la masse atomique de S et MM la masse molaire du polymère synthétisé.

Il est possible d'en tirer le pourcentage Y de radicaux SO_3^- comme étant égal à : $(100 \times \text{S\%} \times \text{MM}) / 247 \times 3200$

30 Dans le deuxième cas, où le groupement Z greffé est par exemple de la tyrosine, le même raisonnement s'applique avec la valeur de l'azote donnée par les résultats de l'analyse élémentaire.

35

B) PROPRIÉTÉS DES POLYMÈRES DE L'INVENTION.

Les propriétés communes aux RGTA et aux HBGFP.

- 5 1) Ils sont dépourvus d'activité anticoagulante significative c'est à dire présenter une activité inférieure à 50 UI/milligrammes comparée à celle de l'héparine dont l'activité est de l'ordre de 150 à 170 UI/milligrammes.
- 10 2) Ils stabilisent et potentialisent les facteurs de croissance présentant une affinité pour l'héparine et en particulier à titre d'exemple le FGF1 et/ou le FGF2 et/ou le TGF β .
- 15 3) Ils protègent ces facteurs contre des agents protéolytiques comme la trypsine.
- 4) Ils inhibent les activités protéasiques impliquées dans le processus inflammatoire comme par exemple élastase leucocytaire et/ou la plasmine.
- 20 5) Ils exercent un effet cicatrisant dans au moins l'un des modèles présentés dans les brevets suscités, à savoir, les muscles, les nerfs, ou le tractus digestif.

Les nouvelles propriétés des RGTA.

- 25 6) Ils protègent et potentialisent les activités enzymatiques impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif comme par exemple la super oxyde dismutase ou SOD. De par cette propriété ils agissent comme agents anti oxydants et peuvent être utilisés seuls ou associés à la SOD dans des indications
- 30 thérapeutiques et/ou cosmétologiques de la SOD ou comme agent protecteur antioxydant notamment dans la protection des aliments ou comme nutriment.
- 7) Ils inhibent l'activité des enzymes comme la Calpaïne
- 35 8) Ils inhibent l'activité des enzymes comme l'héparitinase ou l'héparinase.

5 9) Ils augmentent la survie de cellules soumises à des radiations ionisantes et régulent la sécrétion, sur le plan quantitatif comme qualitatif, des constituants de leur matrice comme les collagènes par exemple.

10 10) Ils agissent comme des agents antifibrotiques en modulant la croissance des cellules mésenchymateuses comme les cellules musculaires lisses, les fibroblastes ou les cellules hépatiques et la qualité du type de collagène qu'elles sécrètent.

11) Ils présentent une dégradabilité lente critère permettant de les différencier des héparanes sulfates qui sont des produits naturellement dégradés par l'héparinase ou l'héparitinase.

15 12) Ils ne contiennent pas et ne libèrent pas après dégradation de produits connus pour leur toxicité comme par exemple peut le faire le CMDBS avec les groupements greffés Z = benzylamine, ce qui exclut donc le CMDBS.

20 13) Ils présentent *in vivo* des capacités de protection et de régénération tissulaire dans les différents modèles suivants :

a) lésion de plaies cutanées,
b) régénération de tissus osseux comme les
25 os longs avec l'exemple du fémur,

c) protection contre la perte de tissu osseux et de régulation de son remaniement comme dans le cas de l'ostéoporose ou des parodonties. De fait ce sont des agents régulateurs de l'homéostasie tissulaire et
30 des masses tissulaires comme la masse osseuse ou musculaire.

d) régénération hépatique ou de protection contre la dégénérescence du système nerveux central et périphérique,

35 e) protection contre les effets délétères des ischémies quelque soit leur localisation.

EXEMPLE 3 : Mesure des activités anti-coagulantes des polymères des exemples 1 et 2.

5 Les tests de coagulation sont réalisés selon la technique du Temps de Céphaline Activée ou T.C.A. (Biggs, 1972, in Human blood coagulation, Oxford Blackwell Scientific Publications). Cent microlitres d'une solution de polymère à différentes concentrations en tampon d'Owen Koller sont incubés 5 minutes à 37°C
10 avec 100 microlitres de plasma pauvre en plaquettes et 100 microlitres d'une solution de céphaline de cerveau de lapin. 100 microlitres de chlorure de calcium 0,25 M sont ajoutés et le temps d'apparition du caillot est repéré par chronométrage.

15 Comme le montre la figure 11, les polymères des exemples 1 et 2 ne présentent pas d'activité anticoagulante supérieure à 50 UI/milligrammes, en particulier par rapport à l'héparine, pris comme
20 contrôle positif. Il convient de remarquer que les valeurs des activités anticoagulantes des produits donnés ici en exemple sont toutes inférieures à 10 UI/milligrammes de produits.

25 EXEMPLE 4 : Stabilisation et potentialisation des polymères des exemples 1 et 2 sur des facteurs de croissance présentant une affinité pour l'héparine et en particulier à titre d'exemple le FGF1 et/ou le FGF2 et/ou le TGF β .

30 Cet exemple considère l'effet des polymères sur la stabilisation du FGF1 et l'effet sur la potentialisation du FGF1 et du FGF2. Ces effets sont évalués sur la croissance des cellules 3T3 BALB/c ou CCL39. Les conditions utilisées pour ces
35 expérimentations sont celles décrites dans l'art

antérieur dans les brevets relatifs aux HBGFPPs incorporées à la présente invention par référence.

5 1) Effets des polymères de l'invention sur la stabilisation des FGF1 ou FGF2.

La figure 12 en annexe représente les effets des RGTA contre des dégradations thermiques à 20° C et à 37° C en fonction du temps d'incubation de FGF2 conservé seul ou en présence des produits testés. L'ED50
10 représente la concentration en mcrogramme/millilitre de FGF1, ici de 6 nanogrammes/millilitre, qu'il faut inoculer à une culture de cellules fibroblastiques, les cellules CCL 39, pour obtenir 50 % du taux maximal d'incorporation de thymidine tritiée.

15 Les résultats obtenus montrent que l'ensemble des polymères testés exercent à 20° C comme à 37° C, de effets protecteurs comparables à ceux de l'héparine, et parfois avec une efficacité plus importante.

20

2) Effets des polymères de l'invention sur la potentialisation des FGF1 ou FGF2.

Le protocole est le même que celui précédemment décrit avec une quantité variable de FGF associée ou non à une quantité constante de polymère.
25 La concentration de polymère retenue correspond à celle qui potentialise au maximum l'effet mitogène du FGF. Ces tests sont faits sur les cellules 3T3 pour le FGF1 et le FGF2. Les contrôles sont les mêmes que ceux cités précédemment à l'exception d'une étude
30 systématique pour chaque test de la valeur de l'ED50.

Les molécules de ces deux familles de polymères testés potentialisent les actions du FGF1 et du FGF2 puisque les valeurs de l'ED50 sont obtenues pour

des valeurs de FGF inférieures ou comparables à celle obtenue en présence d'héparine (figure 13).

5 EXEMPLE 5 : Protection des facteurs contre
 des agents protéolytiques comme la trypsine.

10 La trypsine est une enzyme protéolytique à large spectre d'action qui est utilisée dans les tests in vitro et qui est une des enzymes fonctionnelle
 primordiale dans les processus digestifs.

15 Le test de protection contre la trypsine se déroule ainsi. Un nanogramme/millilitre final de FGF2 iodé ou 5 microgrammes/millilitre final de trypsine sont incubés dans un premier temps 15 minutes
20 à 37°C avec différentes concentrations de polymères (0,5 à 500 microgrammes/millilitre) dans un tampon Tris HCl 100 mM, 0,18 M NaCl, brij 0,03% pH 7,6. 5 microgrammes/millilitre final de trypsine ou 1 nanogramme/millilitre final de FGF2 iodé sont alors
25 ajoutés respectivement. Le volume réactionnel total est de 30 µl. La réaction enzymatique est arrêtée après 2 h d'incubation à 37°C, par addition de tampon Laemmli et un chauffage de 5 minutes à 90°C (Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly
 of the head of the bacteriophage T4, Nature, 1970, 227:680-685).

30 Chaque échantillon est déposé sur un gel de polyacrylamide de 15%. La migration s'effectue pendant 1 h à 200 V dans la glace. Les gels sont séchés 2 h à 80°C sous vide et exposés à -80°C en présence d'un film autoradiographique. L'intensité des bandes est mesurée par analyse d'image et le pourcentage de FGF2 protégé par rapport au FGF2 dégradé calculé

Protection du FGF1 et du TGF β

La figure 14 en annexe présente les effets protecteurs exprimés en % de protection des polymères poly acide β malique sur le FGF1, le FGF2 et le TGF β , vis à vis d'une attaque par la trypsine. La figure 15 présente les effets protecteurs exprimés en % de protection des polymères dérivés de dextrane sur le FGF2 et le TGF β , vis à vis d'une attaque par la trypsine.

Ces polymères exercent pour la plupart d'entre eux un effet protecteur comparable à celui de l'héparine pris comme référence positive.

EXEMPLE 6 : Inhibition des activités protéasiques impliquées dans le processus inflammatoire comme par exemple l'élastase leucocytaire ou la plasmine.

L'élastase leucocytaire et la plasmine sont des protéases clés dans l'installation et le déroulement de la phase inflammatoire. Ces tests visent à établir si les polymères protègent les facteurs de croissance des dégradations par l'élastase leucocytaire humaine.

Les tests de protection contre l'élastase leucocytaire se déroulent ainsi. Le protocole utilisé est le même que celui utilisé avec la trypsine avec 30 nanogrammes/millilitre final d'élastase et 0,5 à 500 microgrammes/millilitre de polymères. Le tampon est du Tris HCl 100 mM, NaCl 0,18 M, 0,03% brij pH8. L'intensité des bandes est évaluée par analyse d'image et le pourcentage de FGF2 non dégradé est calculé. Le contrôle positif pour ces tests est l'héparine. Le dextran T40 et le dextran sulfate ont été pris comme références internes.

La figure 16 rapporte les effets inhibiteurs des différents polymères exprimés par les valeurs des IC50.

5 EXEMPLE 7 : Exemple des effets des RGTA sur la régénération, la protection et la restauration fonctionnelle des tissus : cas de la régénération du muscle squelettique.

10 Le modèle retenu pour apprécier le plus efficacement les propriétés cicatrisantes des RGTA a été celui de l'écrasement musculaire tel que défini et présenté dans le brevet Français n° 2 718 026.

15 Après écrasement du muscle EDL (Extensor Digitorum Longus) de la patte arrière du rat et injection dans le muscle écrasé d'une solution de sérum physiologique contenant ou non les substances à tester, les muscles ainsi traités sont récupérés 8 jours après l'opération. L'analyse du poids associée à une étude
20 histologique permettent de quantifier les effets des polymères sur la régénération musculaire. Les résultats sont exprimés en % par rapport aux caractéristiques d'un muscle n'ayant reçu qu'une injection de sérum physiologique sans polymère dans les mêmes conditions
25 expérimentales. La figure 17 présente les résultats obtenus qui démontrent qu'aussi bien les nouveaux polymères dérivés du squelette de dextrane que les copolymères d'acide β malique exercent les effets revendiqués.

30 Il est important de noter que ces effets sur la régénération musculaire sont obtenus aussi bien par injection in situ des polymères que par injection intra veineuse, intra artérielle ou intra musculaire à partir
35 du moment où les doses injectées en fonction des voies d'administration sont adaptées.

EXEMPLE 8 : Effets des RGTA sur la
régénération de l'os plat.

Le modèle retenu pour évaluer les propriétés
cicatrisantes des RGTA est celui déjà connu de l'art
antérieur et décrit par Blanquaert F, et al. Bone. 1995;
17(6): 499-506).

Ce modèle consiste à pratiquer une
trépanation circulaire de 5 millimètres de diamètre dans
la calvaria d'un rat adulte. Le défaut est comblé par un
tampon de collagène prédécoupé aux mêmes dimensions et
imbibé ou non dans une solution contenant des RGTA. Dans
l'exemple présenté ici, les polymères étudiés sont les
polymères de type CMS (RGTA 1005 et 1012) et les
copolymères d'acide β -malique (RGTA 2011). Le tableau III
ci-dessous présente les pourcentages de comblement
osseux établis par analyse d'image des radiographies
prises 35 jours après le traitement.

Tableau III

| Type de traitement | % de comblement osseux |
|--------------------|------------------------|
| controle | 18 +/- 4,8 |
| RGTA 2011 | 56 +/- 7,0 |
| RGTA 1005 | 54 +/- 6,9 |
| RGTA 1012 | 72 +/- 8,9 |

Les deux types de polymères stimulent donc
la régénération osseuse d'autant que dans ces conditions
de cicatrisation la suture sagittale se reforme *ad
integrum*.

Exemple 9 : Protection et potentialisation
des activités enzymatiques impliquées dans la lutte
contre le stress oxydatif comme par exemple la super
oxyde dismutase ou SOD.

La production d'ions O_2^- et celle de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) représentent des radicaux qui exercent des effets cytotoxiques particulièrement destructeurs. Les SOD ou super oxydismutase sont des enzymes engagées dans la détoxification de ces radicaux. Ce sont des agents qui préservent l'organisme du stress oxydatif.

Les RGTA présentent plusieurs types d'activité vis à vis de la SOD :

- Ils exercent un effet potentialisateur sur l'activité catalytique de la SOD à pH neutre et un effet protecteur et potentialisateur à des pH acide et basique.

- Ils présentent la propriété de protéger les SOD vis à vis des dégradations enzymatiques comme par exemple la trypsine et d'autre part vis à vis de traitements thermiques.

- Sur des modèles de cultures de monocytes activés, ils stimulent les activités catalytique des SOD endogènes et permettent de diminuer la production des ions superoxydes.

Dans tous les cas, les dosages de l'activité SOD sont réalisés selon la technique de Pick, (Freund M et Pick E, The mechanism of action of lymphokines. IX. The enzymatic basis of hydrogen peroxide production by lymphokine-activated macrophages. J Immunol 1986 15;137(4):1312-1318). Cette technique repose sur le dosage des ions O_2^- par réduction du cytochrome c. De la MnSOD (Sigma ref. S 8151) à 30 U/millilitre est mise en solution en présence de différents RGTA à la concentration de 10 microgrammes/millilitre. Ces mélanges subissent différents traitements.

L'activité SOD est évaluée en présence de différentes concentrations de polymères dans des conditions réactionnelles normales.

Soit, les mélanges de SOD et de polymères sont soumis à température ambiante à l'action de la trypsine (même conditions que pour les tests de protection de l'exemple 5) soit ils sont soumis à un traitement thermique à 60° C pendant 30 minutes. L'activité catalytique résiduelle de la SOD de ces mélanges est alors évaluée par les techniques enzymatiques classiques ou sur système cellulaire.

Les échantillons ainsi traités sont incubés dans une suspension de monocytes ($2,5 \cdot 10^6$ cellules/millilitre) stimulés par 200 nM de PMA. Cette condition induit la production d'anion superoxyde par ces monocytes activés en macrophages. La stimulation par le PMA induit une augmentation de la production d'ions superoxyde normalement produits à un niveau basal en l'absence d'activation. L'adjonction de MnSOD active utilisée comme contrôle positif, diminue la quantité d'ions superoxydes produits.

Dans ces conditions, plus la production d'ions superoxydes sera faible, plus l'activité catalytique résiduelle de la SOD contenue dans les mélanges sera élevée. Ces tests permettent donc d'apprécier les effets protecteurs et potentialisateurs des polymères sur l'activité SOD exogène comme endogène.

La figure 18 illustre les effets potentialisateurs des RGTA sur l'activité catalytique de la SOD in vitro à différents pH, la figure 19 les effets protecteurs des RGTA sur la SOD soumise à une attaque par la trypsine ou après un choc thermique et la figure 20 les effets potentialisateurs de l'activité SOD sur la production d'ions superoxydes par des macrophages activés.

Conclusion: Les polymères exercent donc des effets potentialisateurs et protecteurs aussi bien dans des systèmes acellulaires que cellulaires. L'adjonction des différents polymères module donc l'activité

catalytique de SOD ajoutée de façon exogène comme de SOD produite de façon endogène par les cellules.

5 EXEMPLE 10 : Inhibition de l'activité des
 enzymes comme la Calpaïne par les RGTA.

 1) Introduction.

 La calpaïne 1 (Sigma P 4533) est utilisée
dans cet exemple. Ainsi, 0.78 unité d'enzyme (57,2 nM)
10 sont incubées dans 1 millilitre de tampon 50 mM Tris-HCl
 pH 7.4, 0.05% Brij, 2mM CaCl₂, 2 mMMDT et 0.15M NaCl. Les
 solutions de RGTA à tester sont ajoutées pendant 5
 minutes à 27°C. Le substrat (250 micromolaire de N-
 succinyl-leu-tyr-amido-7méthyl coumarin, de chez Sigma
15 (S 1153) est ensuite ajouté dans une cuve en quartz dans
 laquelle le mélange décrit ci-dessus est ajouté. Les
 mesures sont ensuite réalisées toutes les 3 à 5 minutes
 par excitation à 380 nm et détection en fluorescence à
 460 nm de la transformation du substrat en 7 amino-
20 4methyle coumarin (selon le protocole décrit par Sasaki,
 Kikuchi, Yumoto N, Yoshimura et Murachi T, 1984.dans J.
 Biol. Chem 259,(20) p 12489-12494.

 Les résultats obtenus sont résumés dans la
figure 21.

25

 2) Conclusion.

 Des résultats obtenus dans l'inhibition de
l' activité de la calpaïne par les RGTA, nous pouvons
prédire que les RGTA ont une activité de protection
30 contre les lésions induites par les ischémies cérébrales
 comme le laissent prévoir les publications de Markgraf C
 G et col. (Stroke, 1998, 29, 152-158) ou encore Saido et
 al, (Neuroscience. Letters, 1997 16;227:75-78) qui
 décrivent l'effet d'inhibiteurs des calpaïnes comme le
35 MDL28170 ou encore la protéine Calpastatine dans le
 traitement des lésions post ischémique du cortex ou de

l'hippocampe. L'administration par voie locale ou intraveineuse de RGTA aura l'effet inhibiteur des calpaines et favorisera la réparation du tissu nerveux lésé notamment par manque d'apport en oxygène comme c'est le cas des ischémies.

EXEMPLE 11 : Inhibition de l'activité des enzymes comme l'héparitinase par les RGTA.

1) activité inhibitrice des héparinase et héparitinases.

La mesure de l'inhibition par les RGTA des activités héparinase ou héparitinase est réalisée en utilisant comme substrat les héparanes sulfates radiomarqué au soufre 35 et présents dans une matrice extracellulaire synthétisés par des cellules endothéliales cultivées en présence de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ pendant 7 jours. Le protocole utilisé est celui décrit par Ishai-Michaeli R et coll. (Importance of size and sulfation of heparin in release of basic fibroblast growth factor from the vascular endothelium and extracellular matrix. Biochemistry 1992;31(7):2080-2088). La matrice extracellulaire obtenue après élimination des cellules endothéliales est ensuite incubée 24h à 37°C en présence ou en absence d'héparanase et 0.5 microgramme /ml de RGTA.. Afin de mesurer la dégradation des héparanes sulfates radio marqués le milieu d'incubation est collecté et déposé sur une colonne de Sepharose 6B selon le protocole décrit dans Ishai-Michaeli (Biochemistry 1992;31(7):2080-2088). La figure 22 illustre les résultats obtenus. Les héparanes sulfates de haut poids moléculaire correspondant au matériel non dégradé par l'enzyme héparanase sont élués en premier (fractions 3 à 20). Le traitement à l'héparanase induit la disparition de ce pic et l'apparition d'un pic correspondant à des

fractions de petit poids moléculaire d'héparanes sulfate dégradé. (fractions 20 à 40). Dans l'exemple donné l'effet du RGTA 1005 à 50 microgramme/ml induit 50% d'inhibition et 100 microgrammes/ml 100% d'inhibition de l'activité héparanase.

EXEMPLE 12 : Effets des RGTA sur la protection des cellules musculaires lisses intestinales humaines soumises à des radiations ionisantes; effets sur leur survie et sur leurs effets antifibrotiques évalués à travers la quantité et la qualité des collagènes sécrétés.

La formation d'un tissu fibreux ou fibrotique est une étape physiologique essentielle, associée aux processus de réparation et de remodelage tissulaire. Le tissu fibrotique est un tissu de comblement, normalement transitoire, visant à conserver l'intégrité structurale et fonctionnelle des tissus et organes. Il se caractérise par la richesse en collagènes de la matrice extra-cellulaire.

Lorsque cette situation persiste ou se développe, elle correspond à une pathologie illustrant un dérèglement de l'homéostasie structurale et fonctionnelle des tissus et se traduit par une accumulation anormalement élevée de matrice extra-cellulaire qui engendre une fibrose. Une fibrose, quelle que soit son origine se caractérise par :

la présence d'un infiltrat inflammatoire permanent, l'existence d'un déséquilibre dans la balance entre un état prolifératif et quiescent des cellules conjonctives ou mésenchymateuses comme les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses, la destruction progressive du tissu envahi qui se renouvelle peu ou de façon défectueuse, l'existence d'un déséquilibre de la

balance entre la synthèse et la dégradation de la matrice extra-cellulaire.

5 Une fibrose peut être induite soit à la suite d'un traumatisme d'origines variées (infectieux, mécanique, toxique, etc...) soit à la suite de radiations ionisantes (notamment par des rayons γ). Il s'agit dans ce cas des fibroses radioinduites comme c'est fréquemment le cas chez les patients ayant subi une radiothérapie.

10 Les collagènes sont les composants majeurs de la matrice extra-cellulaire des tissus normaux comme des tissus fibrotiques. Ils sont essentiellement synthétisés par les cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. Dans un
15 tissu fibreux, le collagène total est quantitativement augmenté, en raison de modifications affectant aussi bien, sur le plan quantitatif que qualitatif, la synthèse et/ou la dégradation des collagènes, c'est à dire la dynamique du remodelage. Les fibroses se
20 caractérisent par une augmentation du collagène de type III, et ceci préférentiellement lors de fibroses radio-induites. Cette augmentation de collagène de type III est associée à une augmentation mais dans une moindre importance du rapport entre le collagène de type III et
25 le collagène de type I. Un autre collagène, le collagène de type V, est associé à la qualité de l'organisation des fibres de collagènes dans la matrice c'est à dire la fibrillogenèse. Dans les tissus fibrotiques, l'effondrement du taux de collagène de type V est une
30 des origines de la déstructuration des fibres de collagène de la matrice extracelulaire.

Le modèle cellulaire considéré dans cet exemple est celui des cellules HISM, Human Intestinal Smooth Muscle cells, (American Type Culture Condition,
35 Rockville, Maryland ATCC CRL 192), issues de la muscularis propria de jéjunum humain (Graham

M., Diegelmann R., Elson C., Bitar K. and Ehrlich H. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 176 (1984) 503.). Cette lignée de cellules musculaires lisses intestinales humaines a été utilisée pour apprécier les effets des radiations sur la survie cellulaire et l'induction de phénomènes fibrotiques analysés à travers la quantité et la qualité des types de collagène sécrétés par des cellules normales ou en situation d'inflammation ou de processus de réparation par une fibrose.

Les cellules sont cultivées en milieu DMEM contenant 1 g/l de glucose, 1% de L-glutamine, 1% pénicilline-streptomycine et 10% de sérum de veau foetal et conservées dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée à 5% de CO₂ et 95 % d'humidité relative, dans des flasques 75 cm². Les cellules HISM sont ensemencées sur plaques 24 puits à fond plat à raison de 20 000 cellules par puits. Le volume de chaque puits est complété à 2 milliL de milieu. Plusieurs cinétiques de croissance sont réalisées en présence ou non de RGTA à différentes concentrations allant de 0,4 à 400 microgrammes/milliL.

L'irradiation est effectuée à partir d'une source d'irradiation de ⁶⁰ Cobalt dans un incubateur où les plaques de culture sont disposées. Deux boîtes sont soumises simultanément à cette irradiation dont la source est verticale et dont les doses sont évaluées en fonction de la surface irradiée. Le débit de l'irradiateur est de 1 Gy/mn. Les doses absorbées sont de 10 Gy pour un temps d'irradiation par boîte de 10 minutes.

Différents protocoles sont utilisés pour apprécier le rôle des RGTA selon qu'ils sont ajoutés au milieu de culture avant, pendant ou après l'irradiation c'est à dire sur un plan préventif, curatif ou les deux à la fois. Le tableau IV ci-dessous précise les différents protocoles.

Tableau IV

| Séquence | RGTA | irradiation | RGTA |
|----------------------|------|-------------|------|
| Témoin | - | - | - |
| Irradiation | - | + | - |
| Curatif | - | + | + |
| Préventif | + | + | - |
| Préventif et curatif | + | + | + |

5 L'effet préventif est évalué par adjonction de RGTA (+) à la dose de 400 microgrammes/mL dans le milieu de culture, 48 heures avant l'irradiation. L'effet curatif est apprécié par adjonction de RGTA 2 heures après l'irradiation aux mêmes doses que pour l'effet préventif. Pour les effets cumulés préventifs et
10 curatifs, les cellules sont continuellement cultivées en présence des mêmes doses de RGTA.

72 heures après l'irradiation, les cellules sont incubées dans un milieu dépourvu de sérum en présence de proline tritiée (10 microCi/mL) et d'acide
15 ascorbique (50 microgrammes/mL) pendant 24 heures. Le surnageant est alors prélevé et la couche cellulaire récupérée à l'aide d'un robber-policeman dans un volume final de 18 mL. Les milieux de culture et les couches cellulaires récupérées sont extensivement dialysées
20 (seuil de coupure de 6 à 8 kDa) contre de l'eau courante (24 heures à 4°C) pour éliminer les petites molécules des macromolécules. Après dialyse, des fractions aliquotes sont prélevées et hydrolysées (HCl 6M, 105°C, 24 h) pour déterminer la radioactivité de
25 l'hydroxy(³H)proline, marqueur spécifique des collagènes. A ce stade, une fraction aliquote est utilisée pour quantifier par comptage de la radioactivité, la synthèse totale de collagènes.

30 Le volume restant est à nouveau dialysé en présence de pepsine et de collagène I contre de l'acide acétique 0,5 M pendant 24 h à 4°C. La pepsine va digérer

les contaminants non collagéniques qui seront éliminés dans le dialysat sous forme de peptides. Du collagène de type I est ajouté afin d'augmenter la proportion de collagène qui est faible dans chaque échantillon et de tendre vers un rapport enzyme/substrat de 1/5. Les conditions de réaction sont les suivantes : 1 mL de solution de pepsine (0,5 M) + 1 mL de solution de collagène I (0,5 M) + 0,514 mL d'acide acétique pour avoir une concentration finale en acide acétique de 0,5M, dans un échantillon de 18 mL. Chaque dialysat ainsi obtenu est lyophilisé à froid (-50°C) et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Les différentes chaînes α de collagène sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) selon la méthode de Leammli, après réduction avec du β mercaptoéthanol. La radioactivité incorporée dans chaque collagène est déterminée par hydrolyse des chaînes α issues du découpage des bandes de gel correspondant à chaque chaîne de collagène d'un type précis. Celles-ci sont ensuite dissoutes dans de l'eau oxygénée à 60°C et la radioactivité contenue dans les différentes bandes dissoutes est comptée au compteur β à scintillation liquide ou par autoradiographie directe des gels.

La séparation électrophorétique est réalisée avec 5 microlitres de collagène V et 50 microlitres de chaque échantillon réduit.

Ces gels permettent plusieurs types d'exploitation :

- La détermination des différents types de collagène par analyse de la radioactivité incorporée.

- La quantification de ces différents types de collagène par analyse densitométrique après autoradiographie.

Les fractions aliquotes prélevées après la dialyse contre de l'eau courante sont hydrolysées (HCl 6M, 105°C, 24 h) en ampoules scellées. L'acide acétique est ensuite évaporé, puis le contenu de l'ampoule est resuspendu dans 1 ml d'eau distillée. La proline et l'hydroxyproline sont séparés par la méthode de Rojkind et Gonzales (Rojkind M et Gonzalez E, An improved method for determining specific radioactivities of proline-14C and hydroxyproline-14C in collagen and in noncollagenous proteins. Analytical Biochemistry 1974;57(1):1-7). Le principe consiste à oxyder la proline et l'hydroxyproline par la chloramine T. La proline est transformée en pyrroline carboxylate soluble dans le toluène alors que l'hydroxyproline est transformée en carboxylate soluble dans l'eau. Après traitement, les deux fractions proline et hydroxyproline sont récupérées pour chaque échantillon et quantifiées par mesure de la radioactivité.

En conditions normales, les cellules HISM se caractérisent par la quantité de collagène synthétisé (figure 23) et surtout, sur le plan qualitatif, par le phénotype des collagènes sécrétés (figure 24).

Dans des conditions normales, le collagène majoritaire est le collagène de type I. Les collagènes de type III et de type V sont minoritaires. La quantité de collagène de type V est associée à la qualité de l'organisation de la fibrillogenèse.

Le collagène de type III est un "collagène d'alerte", synthétisé en théorie de façon transitoire dans le cas d'une réaction à un stress mais de façon permanente dans le cas d'une fibrose. La quantité proportionnelle de collagène de type III par rapport au collagène de type I augmente de façon importante dans les situations de réponse à une lésion tissulaire, un stress ou une agression comme par exemple des radiations ionisantes. Le collagène de type III devient

prépondérant dans les matrices des tissus présentant une réaction fibrotique aiguë comme chronique. Ce collagène peut être considéré comme un composant signalétique de la réaction fibrotique.

5 Lorsque les cellules HISM sont cultivées dans des conditions témoins c'est à dire sans RGTA, elle synthétisent ces trois types de collagènes (figure 24). L'irradiation modifie la quantité (figure 23) et la qualité (figure 24) des collagènes élaborés. La synthèse
10 globale de collagène augmente de près de 50 % (figure 23). La sécrétion ce collagène de type I et surtout de type II augmente considérablement (respectivement de 50 % et de près de 500 %). A l'inverse, la synthèse de collagène de type V diminue de plus de 50 %.

15 La présence de différents RGTA (RGTA 1005 et RGTA 1025) restaure presque à l'identique le comportement témoin des cellules malgré leur exposition à l'irradiation. La figure 23 montre que la synthèse
20 globale de collagène revient à des valeurs normales en particulier pour les conditions de traitements préventifs ou cumulés (Prév + Cur). La figure 24 confirme ce retour à une homéostasie de référence en particulier dans le cas des traitements cumulés. Les
25 traitements curatifs comme préventifs exercent les mêmes types d'effets, surtout en ce qui concerne les valeurs des rapports de sécrétion des collagènes de type I et de type III qui retrouvent des valeurs comparables à celles
30 des cellules témoins. Ces RGTA restaurent le fonctionnement des cellules HISM vis à vis des collagènes.

 Ils agissent également sur la survie des cellules (figure 25). L'irradiation provoque en effet une mortalité cellulaire importante de plus de 50 % de la population irradiée. En présence des polymères, un
35 effet protecteur net est enregistré puisque la mortalité

est réduite à environ 25 %, l'effet le plus marqué étant obtenu pour les traitements cumulés préventif + curatif.

5 EXEMPLE 13 : Action comme agents
antifibrotiques en modulant la croissance des cellules
mésenchymateuses comme les cellules musculaires lisses,
les fibroblastes ou les cellules hépatiques et la
qualité du type de collagène qu'elles sécrètent.

10 Comme exposé dans l'exemple 12 précédent, la fibrose traduit une altération de la croissance des cellules mésenchymateuses associée à une modification de la quantité et de la qualité des collagènes synthétisés.

15 Ce exemple utilise un autre modèle cellulaire que sont les cellules musculaires lisses d'aorte de porc. Ces cellules sont obtenues selon la méthode des explants à partir d'aortes. L'aorte est composée de 3 couches cellulaires : l'adventice (couche externe) qui contient les cellules fibroblatiques, la
20 média (couche centrale) qui contient les cellules musculaires lisses (CML) et l'intima (couche interne) qui contient les cellules endothéliales.

 La média, après prélèvement est dilacérée en petits morceaux. Les explants sont mis en culture en
25 flasque 25 cm² contenant du DMEM 1 g/L de glucose, avec rouge de phénol, additionné de 20% de sérum de veau foetal (SVF), 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline-streptomycine. Les cellules se détache de ces explants et vont coloniser le milieu (stade P0). Au bout de 2
30 semaines de mise en culture, les cellules sont congelées à une densité cellulaire de 2 millions de cellules dans du DMSO 10 % et DMEM 20% SVF.

 Les cinétiques de croissance sont effectuées en évaluant le nombre de cellules par puits à l'aide du
35 compteur automatique de particules (Coulter Counter ZM, Coultronics) étalonné préalablement par une évaluation

du diamètre des cellules à l'aide d'une cellule de Malassez. Chaque comptage est réalisé sur une moyenne de 4 puits à partir desquels les cellules sont détachées à l'aide de 500 microL/puits d'une solution de trypsine-EDTA (10mM).

Les CML sont ensemencées dans les mêmes conditions d'expérimentation que les cellules HISM. Les cinétiques de croissance sont réalisées en présence ou non de polymères des séries RGTA 1000 à 1025 pour les polymères ou Z est rien, et quand Z existe, pour les séries des RGTA 1110 à 1115 ou d'héparine à titre de contrôle, aux différentes concentrations allant de 0,4 à 400 mg/mL.

Le pourcentage d'inhibition de la prolifération est calculé selon la formule suivante :

$$I\% = 100 \times (1 - \text{croissance nette avec polymères}) / \text{croissance nette témoin})$$

où la croissance nette représente la différence entre la quantité de cellules dénombrées lorsqu'elles sont à confluence avec le nombre de cellules ensemencées en début de mise en culture.

Le témoin correspond aux cultures de CML en absence de polymères. L'héparine et les RGTA représentent les différents effecteurs testés, susceptibles de modifier l'activité biologique de la cellule.

Dans les mêmes conditions que les cellules HISM, la synthèse et le typage des collagène par les CML a été réalisé.

La figure 26 présente les résultats obtenus. Les RGTA exercent un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules musculaires lisses comparable à celui de l'héparine utilisée comme molécule de référence contrôle comme l'illustrent les valeurs des deux premières colonnes. Cependant et à la différence de

l'héparine, ces polymères rétablissent le phénotype de sécrétion des collagènes. En effet le taux de synthèse global des collagènes est significativement diminué en présence des RGTA 1005, 1012 et 1013. Sur le plan qualitatif, ces mêmes polymères à l'inverse de l'héparine diminuent le taux de synthèse de collagènes de type I et de type III alors qu'ils augmentent la sécrétion de collagène de type V.

Ces effets confirment les propriétés antifibrotiques des polymères de l'invention.

EXEMPLE 14 : Effets des RGTA sur la régénération de la peau de rat.

Cet exemple illustre l'effet des RGTA sur la cicatrisation cutanée profonde après suture chez le rat.

Des rats mâles Hairless de 250 grammes sont anesthésiés par une injection IM de Kétamine et de Largactil. Deux excisions de 3 cm sont pratiquées latéralement par rapport à l'axe de symétrie dorsal des animaux de chaque côté de la colonne vertébrale (figure 27). Par rapport aux animaux témoins non traités par le RGTA 1012, les animaux traités reçoivent en intramusculaire une injection d'une solution de RGTA 1012 à 1 milligramme par kilogramme 30 minutes avant l'excision et 100 microlitres d'une solution à 100 microgrammes par millilitre en application topique sur la plaie juste avant la suture. La suture est effectuée en un seul plan par un surjet intradermique au prolène 2-0. Les rats traités et contrôles sont macrophotographiés aux jours 7, 21 et 60 après l'opération. A chacun de ces délais, trois rats de chaque série expérimentale sont euthanasiés en vue d'une étude histologique des prélèvements cutané cicatriciels.

La figure 27 montre les effets des RGTA sur la cicatrisation cutanée :

- Figure 27-A : Incision cutanée profonde réalisée jusqu'au plancher musculaire sousjacent de 3 cm de long de part et d'autre de la colonne vertébrale.

5 - Figure 27-B : Vue dorsale de l'animal après suture des berges de la plaie par surjet

10 - Figures 27-C : Aspect des cicatrices après dix jours après le traitement. C1 et C2 correspondent à un animal controle, traité par du sérum physiologique sans RGTA 1012. En C1 les fils n'ont pas été enlevé au contraire de la photographie C2. La cicatrice est visible et présente encore des croutes de sang coagulé en particulier au niveau des traces des aiguilles utilisées pour la suture. C3 et C4 correspondent à un animal traité par du sérum physiologique contenant du
15 RGTA 1012. Dans le même temps les cicatrices ne sont plus visibles. Les fils de la suture sont visibles sur la figure C3 alors qu'ils ont été enlevés sur la figure C4. Sur cette photographie seul un fin liséré marque l'incision d'origine.

20 - Figures 27-D : Analyse histologique. D1 et D2 présentent les coupes histologiques de la peau ayant été incisée 60 jours au préalable. D1 correspond à un animal controle, traité par du sérum physiologique sans RGTA 1012, la figure D2 à à un animal traité par du
25 sérum physiologique contenant le RGTA 1012. En D1, le derme sous jacent à un épithélium encore imparfaitement mature n'a pas retrouvé une structure identique à celle d'une peau normale. Le remodelage est très partiel. A l'inverse, en D2 la peau a retrouvé une structure et une
30 organisation identique à celle d'une peau qui n'aurait jamais été lésée. La seule trace d'une cicatrice est visible dans la profondeur du derme qui laisse encore détectée une zone incomplètement remodelée. Dans ce dernier cas, il y a absence totale de cicatrice externe.

35

Les photographies de la figure 27 montrent au bout de 7 jours la disparition de cicatrice superficielle que les fils aient (C4) ou non (C3) été enlevés alors que les animaux controle laissent apparaitre une cicatrice dans les deux conditions précitées (C1 et C2).

Une analyse histologique pratiquée à 60 jours montre que les peaux des animaux non traités (D1) présentent un derme absolument pas mature alors que les animaux traités par les RGTA ne laissent apparaître qu'une légère trace dermique en profondeur. L'histologie de la peau des animaux traités (D2) est d'un aspect comparable à une peau d'un animal témoin non soumis à un quelconque processus cicatriciel. Dans ce modèle, les RGTA non seulement accélèrent la vitesse de cicatrisation du plancher cutané mais aussi et surtout permettent un remaniement du tissu cicatriciel qui aboutit à un tissu régénéré dans lequel aucune trace de fibrose n'est détectable. Ils apparaissent avec cet exemple comme des régulateurs particulièrement puissants de l'homéostasie tissulaire.

Exemple 15 : Effets de protection contre l'ischémie par les RGTA.

Cet exemple illustré avec le polymère RGTA 1005 démontre les effets de protection des RGTA contre la souffrance tissulaire qui permettent de conserver 80 % de la masse d'un organe en comparaison des organes non traités (figure 28). Ces effets de protection des RGTA contre les effets délétères provoqués par le stress induit par un manque d'apport d'oxygène résultant d'une ischémie des muscles sont présentés dans l'expérimentation décrite ci-dessous.

Le modèle utilisé est inspiré du modèle décrit par Hansen-Smith, F.M., Carlson, B.M., & Irwin,

K.L. (1980, Revascularization of the freely grafted Extensor digitorum Longus muscle in the rat. *Am. J. Anat.* 158, 65-82). La procédure expérimentale consiste à sectionner le tronc neurovasculaire des muscles EDL (Extensor Digitorum Longus) sur les deux pattes arrières de rats adultes Wistar (350g) au niveau de son entrée dans le muscle et à compléter l'ischémie par une ligature des deux tendons. Une injection de 100 microlitres d'une solution de RGTA 1005 à 50 microgrammes par millilitre dans du sérum physiologique est alors effectuée directement dans un muscle EDL. Dans l'autre muscle controlatéral, le même volume de sérum physiologique sans RGTA est injecté.

7 jours après l'injection, les muscles sont retirés et examinés après préparation histologique au microscope. Dans chaque groupe de muscle, traité et non traité, un ensemble de paramètres tels le diamètre moyen du muscle, l'épaisseur de l'épimysium, de la zone périphérique, le diamètre moyen de la zone ischémisée a été mesuré à l'aide d'un objectif x10 et d'une échelle micrométrique. Le nombre de couches de fibres musculaires ayant survécu à l'ischémie dans la zone périphérique a été compté sur trente champs différents pris au hasard et observés à l'aide d'un objectif x20.

La figure 28 montre les effets protecteurs des RGTA (RGTA 1005) contre la souffrance tissulaire dans un modèle d'ischémie musculaire chez le rat. La figure 27-A et la figure 27-B montrent respectivement deux coupes histologiques de muscles de rats contrôle (27-A) et traité (27-B) par une solution de RGTA 1005. Chez le contrôle, l'ischémie a provoqué la dégénérescence des fibres musculaires à l'exception d'une couronne de fibres périphériques au contact de l'épimysium. L'administration de RGTA 1005 limite de façon considérable la dégénérescence des fibres

musculaires situées en profondeur tout comme elle diminue de façon très significative la réaction inflammatoire et les dégradations qu'elle provoque. Le RGTA 10015 préserve donc les cellules des effets délétères provoqués par l'ischémie.

On observe sur la figure 28 qu'après une semaine, le diamètre moyen n'est pas modifié après traitement au RGTA ($5,2 \pm 0,3\text{mm}$) par rapport au diamètre ($5,1 \pm 0,2\text{mm}$) d'un muscle témoin non lésé. La réaction inflammatoire dans l'épimysium est diminuée dans les muscles traités au RGTA d'une manière très significative puisque les épaisseurs des épimysiums sont de 10 ± 5 micromètres avec traitement par le RGTA en comparaison de 85 ± 10 micromètres sans traitement avec du RGTA ($p < 0,01$). La zone centrale ischémisée des muscles EDL non traités au RGTA présente un diamètre moyen de $4,4000 \pm 100$ micromètres dans laquelle les fibres musculaires ont complètement disparu. Cette zone est entourée d'une zone périphérique de 270 ± 50 micromètres contenant une moyenne de $3,2 \pm 0,5$ couches de fibres musculaires. Le traitement au RGTA est caractérisé par une nette diminution de l'importance de la zone centrale dégénérée dont le diamètre moyen est de 3600 micromètres ± 200 ($p < 0,05$) et d'une augmentation de la zone périphérique dont l'épaisseur est de 700 ± 40 ($p < 0,05$) micromètres et qui contient $8,3 \pm 1,8$ ($p < 0,01$) couches de fibre.

EXEMPLE 16 : Effets des RGTA sur la régénération des os longs.

Cet exemple illustre la reconstruction d'un défaut osseux, pratiqué dans le tube diaphysaire d'un fémur de rat, à l'identique avec au bout de 8 semaines et mieux à 12 semaines une reconstitution d'un canal

médullaire identique à celui d'origine et de corticales matures comme dans l'os non fracturé d'origine (figure 29).

Des rats mâles Wistar (Ico: WI (IOPS
5 AF/Han), Iffa Credo) de 275 à 325 grammes sont utilisés. L'étude est réalisée en accord avec les recommandations de la CEE sur le travail sur animal (décret 87-848 -
10 04/19/1987). Sous anesthésie, par injection de pentobarbital de sodium, le fémur est abordé latéralement. Les tissus musculaires et périostiques sont désolidarisés du tube diaphysaire. Une plaque en polyéthylène de haute densité est fixée à la surface du fémur par des broches de Kirschner. Un défaut segmentaire de 5 millimètres est pratiqué au milieu de
15 la diaphyse fémorale. Un implant est inséré à la place du défaut osseux avant suture des tissus. Cet implant correspond à une matrice osseuse allogénique déminéralisée préparée avec des diaphyses fémorales d'autres rats selon la procédure décrite par
20 F. Blanquaert et coll. (1995, Bone 17:499-506), imprégnée ou non de RGTA 1012 par incubation dans une solution saline comprenant 100 microgrammes par millilitre de ce produit. Les animaux sont ensuite maintenus en cage sans contrainte déambulatoire. Les
25 fémurs des animaux sont radiographiés toutes les deux semaines pendant 12 semaines avant d'être euthanasiés. Les fémurs sont alors prélevés et soumis aux traitements nécessaires à une étude histologique. Les radiographies sont étudiées en particulier au niveau de leur
30 densitométrie par analyse d'images.

La figure 29 montre les effets des RGTA sur la régénération des os longs et rapporte plus particulièrement les études histologiques et
35 radiographiques de fémurs de rat traités ou non par du RGTA 1015.

La figure 28-A présente le modèle de défaut pratiqué dans la diaphyse fémorale.

5 Les figures 28-B, 28-D, 28-F et 28-H représentent des radiographies de fémur de différents groupes expérimentaux. Les figures 28-C, 28-E et 28-G représentent des coupes histologiques des pièces opératoires correspondant respectivement aux spécimens présentés en 28-D, 28-F et 28-H.

10 Sur les figures 28-C et 28-D, on observe que le défaut fémoral n'a reçu aucun traitement particulier. Il n'y a pas eu en 12 semaines de phénomène cicatriciel et le fût osseux n'est pas reconstitué.

15 Sur les figures 28-E et 28-F, on observe que le défaut osseux a été comblé par de la matrice osseuse déminéralisée. Dans ce cas, le comblement est effectué mais aucun remaniement n'est observable. La structure de comblement ne présente pas l'organisation d'un os long traditionnel.

20 Sur les figures 28-G et 28-H, on observe que le défaut osseux a été comblé par de la matrice osseuse déminéralisée imprégnée dans une solution de RGTA 1015. Dans ce cas, la structure des tissus de comblement correspond à celle d'un os normal. L'os compact cortical est en relation avec la zone non lésée dans laquelle on
25 peut voir l'empreinte des vis de fixation. Cette partie délimite une cavité remplie de moelle osseuse en continuité avec la cavité médullaire d'origine.

30 Les figures 28-I1, 28-I2, 28-J1 et 28-J2 montrent l'effet du RGTA 1015 sur la vitesse de reformation de l'os long. Les radiographies I1 et I2 sont prises à 8 semaines, les radiographies J1 et J2 à 12 semaines. I1 et J1 correspondent au traitement présenté en 28-E et 28-F où le défaut osseux a été
35 seulement comblé par de la matrice osseuse déminéralisée san. RGTA. I2 et J2 correspondent au traitement présenté en 28-G et 28-H où le défaut osseux a été comblé par de

la matrice osseuse déminéralisée imprégnée dans une solution de RGTA 1015. Ces radiographies montrent une accélération de la cicatrisation et surtout de la maturation des os reformés surtout en ce qui concerne une corticalisation nette (I2 et J2) non détectable en I1 et J1. Le RGTA 1015 agit comme un agent de régénération qui permet de reconstituer, dans un délai accéléré, une structure osseuse d'os long identique à la structure de l'os d'origine.

Ainsi donc et de façon étonnante, le RGTA 1012, imprégné dans la matrice osseuse déminéralisée en comparaison d'une matrice imprégnée dans du sérum physiologique sans le polymère induit une accélération tout à fait significative sur les processus de remodelage et de maturation osseuse. Cet effet se manifeste par l'apparition de nouvelles corticales après seulement 8 semaines alors que dans les conditions contrôles ce phénomène ne se déroule pas. Après 12 semaines, six des sept animaux traités par l'association avec du RGTA 1012 présentent à l'étude radiologique les évidences d'une union complète du défaut avec la reformation de corticales épaisses et délimitées tandis que sans le CM_1DS_2 seule l'union est observée avec des images radiologiques d'os immature sans corticalisation. Une étude quantitative en analyse d'image des radiographies confirme ces observations. Cette étude précise par ailleurs que le profil des os traités par le RGTA 1012 est comparable à celui d'un os normal, à la seule différence que le matériel osseux est d'une densité relativement plus faible dans les délais expérimentaux considérés de 12 semaines. La projection de la densité de l'os néoformé dans le défaut d'origine révèle que le traitement par le polymère RGTA 1012 induit un remodelage tissulaire à travers la reformation de corticale et d'un canal médullaire.

Les études histologiques corrélient et confirment les résultats établis par analyse d'image des données radiologiques. Ces études histologiques démontrent la présence de nouvelles corticales constituée d'os compact avec encore quelques régions de moelle et la présence d'un canal médullaire en continuité avec le fut diaphysaire d'origine, rempli de nouvelle moelle osseuse. Les fémurs traités sans RGTA 1012 ne montrent aucune figure de maturation. L'os reconstitué ne présente pas d'organisation particulière. Il est constitué d'un mélange hétérogène d'os compact et de tissu médullaire sans délimitation particulière du territoire.

Ces résultats illustre les effets ostéoinducteurs des polymères de l'invention sur leur capacité à induire non seulement la réparation des os longs mais aussi et surtout leur potentiel à réguler l'homéostasie des tissus régénérés au niveau de leur masse comme de leur remodelage.

Les propriétés des RGTA comme agent régulateur de l'homéostasie des tissus osseux, c'est à dire sur la masse tissulaire, sa fonctionnalité et son remodelage sont confirmées par l'exemple 17 ci-après.

EXEMPLE 17 : Effets des RGTA, sur le remaniement et la protection de la masse osseuse dans un modèle de parodontie aigue chez le hamster.

Le modèle utilisé dans cet exemple concerne le remaniement osseux de la mandibule de Hamster.

Une parodontie est induite chez des Hamsters dorés de Syrie (centre d'élevage Dépré, références HSM 41/50) après deux mois d'une alimentation hyperglucidique. Le régime administré se compose de saccharose (56 %), lait en poudre écrémé (28 %), farine

complète de blé (6 %), levure de bière (4 %, luzerne en poudre (3 %), poudre de foie (1 %) et chlorure de sodium (2 %).

5 Les animaux sont répartis en groupes
expérimentaux. 14 animaux constituent les groupes
témoins qui reçoivent une alimentation normale à base de
biscuit et de croquette. 24 animaux constituent les
groupes expérimentaux soumis au régime hyperglucidique.
10 Ils développent une parodontie chronique établie au bout
de deux mois. Les groupes expérimentaux reçoivent après
ce délai, chaque semaine pendant 3 semaines, une
injection intramusculaire de RGTA 1005 à différentes
doses comprises entre 0,1 et 15 milligrammes par
15 kilogramme sous un volume de 0,5 millilitres de sérum
physiologique tamponné. Les groupes contrôles reçoivent
une injection de sérum physiologique sans RGTA 1005
(SHAM). Le poids des animaux est relevé chaque semaine.
Un mois après chaque type de traitement, les animaux
sont sacrifiés, les mandibules prélevées et préparées
20 pour une étude histologiques. Les inclusions des pièces
opératoires sont réalisées dans du méthyl métacrylate
stabilisé.

Dans ce modèle de parodontite, seuls 200
micromètres sont exploitables en hauteur pour chaque
25 hémimandibule. Le système est standardisé de façon
étudier toujours la même séquence de coupes à une
profondeur définie et repérée par le tissu osseux
compris entre les racines des deux premières molaires du
coté lingual.

30 La maladie parodontale, au niveau de ces
molaires se manifeste par l'apparition d'une poche
parodontale qui délimite un volume rempli de plaque
bactérienne. Cette maladie entraîne une destruction
importante de l'os parodontal qui se caractérise par une
35 importante résorption ostéoclastique et une réduction

des surfaces osseuse en apposition c'est à dire à une phase d'ostéosynthèse.

La résorption osseuse est quantifiée en mesurant les zones de contact entre l'os et les ostéoclastes (Oc). Ce sont des cellules géantes colorées en bleu par le bleu de toluidine. L'apposition quant à elle se caractérise par une bande de tissu ostéoïde, identifiée par une coloration bleu atténuée recouverte d'ostéoblastes. A l'inverse des OC, les ostéoblastes sont des cellules de petite taille, de forme cubique et mononuclées. Les quantifications de ces phénomènes se font à l'aide d'une station d'imagerie assistée d'un logiciel de traitement d'images.

La figure 30 présente les quantifications obtenues dans les différentes conditions expérimentales. Chez les animaux témoins qui n'ont pas développé la maladie, l'activité de la résorption est quasiment nulle alors que celle de l'apposition est importante. Chez les animaux non traités (SHAM), la maladie est fortement développée et se caractérise par une forte résorption et un faible taux d'apposition. Chez les animaux traités par du CM₁DS₂, et en particulier à la dose de 1,5 milligrammes par kilogramme, le taux de résorption est fortement diminué et est associé à une augmentation très importante du taux d'apposition qui atteint près de 80 % du taux établi chez les témoins.

Ces effets sont obtenus par injection intramusculaire. Ils montrent que les RGTA régulent la masse du tissu osseux en rééquilibrant la balance du remodelage entre la résorption et l'apposition.

EXEMPLE 18 : Données pharmacocinétiques montrant les propriétés des RGTA pour vectoriser des molécules vers des tissus lésés.

Cet exemple illustre la capacité que présentent les polymères de l'invention à se fixer de façon spécifique et à se concentrer au niveau des sites de souffrance tissulaire.

5 Dans le modèle de la régénération du muscle soumis à un écrasement, décrit dans l'exemple 7, une lésion est pratiquée sur l'EDL de la patte gauche des animaux. Chaque animal reçoit une injection intraveineuse de $2 \cdot 10^6$ cpm de RGTA 1012 radiomarké au tritium par les soins de la société SibTech, Inc. (NY, USA). L'activité spécifique de ce traceur est de 20 milliCurie par milligramme.

10 A différents temps post-opératoires, les muscles EDL lésés des pattes gauches et ceux non lésés des pattes droites sont prélevés et congelés dans l'azote liquide. La réalisation de coupes histologiques en congélation permet grâce à un beta imager (Société Biospace) de mesurer la quantité de produit radiomarké fixé au niveau des coupes des tissus étudiés. Les résultats rapportés dans le tableau V ci-dessous montre que les muscles lésés concentrent dès 24 heures une quantité de produit radioactif environ 5 fois plus élevée que les muscles non lésés dont le niveau de marquage ne diffère pas du bruit de fond de l'appareil.

25

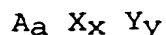
Tableau V

| Temps post-opératoires | cpm de RGTA 1012 fixé au niveau des tissus | | |
|---------------------------------------|--|--------------|------------|
| | 24 heures | 48 heures | 96 heures |
| Tissu musculaire lésé | 11800+/-890 | 10150+/-1020 | 9000+/-790 |
| Tissu musculaire témoin controlatéral | 2060+/-530 | 1980+/-390 | 1870+/-640 |
| Bruit de fond de l'enregistrement | 1800+/-160 | 1780+/-210 | 1950+/-180 |

5 Ces résultats démontrent les capacités d'autociblage des polymères de l'invention qui se concentrent spécifiquement au niveau des tissus présentant une souffrance ou une lésion. Une propriété particulièrement intéressante de ces polymères réside donc également dans leur capacité de vectorisation d'un principe médicamenteux ou de diagnostic.

REVENDECATIONS

Polymères biocompatible constitué par un enchaînement de motifs identiques ou différents, de formule générale (I) suivante :



dans laquelle :

- A représente un monomère;

- X représente un groupement carboxyle fixé sur un monomère A et répondant à la formule suivante : -R-COO-R', où R est une liaison ou une chaîne hydrocarbonée aliphatique, éventuellement ramifiée et/ou insaturée et qui peut contenir un ou plusieurs cycles aromatiques à l'exception de la benzylamine et de la benzylamine sulfonate, et R' représente un atome d'hydrogène ou un cation,

- Y représente un groupement sulfate ou sulfonate fixé sur un monomère A et répondant à l'une des formules suivantes : -R-O-SO₃-R', -R-N-SO₃-R', -R-SO₃-R', où R est une liaison ou une chaîne hydrocarbonée aliphatique, éventuellement ramifiée et/ou insaturée et qui peut contenir un ou plusieurs cycles aromatiques à l'exception de la benzylamine et de la benzylamine sulfonate, et R' représente un atome d'hydrogène ou un cation,

- a représente le nombre de monomères A, qui est tel que la masse desdits polymères de formule (I) est supérieure à environ 5 000 daltons

- x représente le taux de substitution de l'ensemble des monomères A par les groupements X, lequel est compris entre environ 20 et 150%, et de préférence est de l'ordre de 50%,

- y représente le taux de substitution de l'ensemble des monomères A par les groupements Y, qui est compris entre environ 30 et 150%, et de préférence est de l'ordre de 100%.

- 2) Polymère biocompatible selon la revendication 1, caractérisé en ce que le radical R des groupement X et Y, est choisi parmi un groupement alkyle, allyle, aryle, linéaires ou ramifiés.
- 5
- 3) Polymère biocompatible selon les revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les monomères A, identiques ou différents, sont choisis parmi les sucres, les esters, les alcools, les acides aminés, les nucléotides.
- 10
- 4) Polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les monomères A, identiques ou différents, sont des oses, plus particulièrement le glucose.
- 15
- 5) Polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des groupements chimiques fonctionnels Z, différents de X et Y, capables de conférer aux polymères de l'invention des propriétés biologiques ou physicochimiques supplémentaires.
- 20
- 6) Polymère biocompatible selon la revendication 5, caractérisé en ce que le taux de substitution de l'ensemble des monomères A par des groupements Z est compris entre 0 et 50 %, et de préférence de l'ordre de 30%.
- 25
- 7) Polymère biocompatible selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que le groupement Z est une substance capable de conférer au polymère une meilleure solubilité ou lipophilie.
- 30
- 8) Polymère biocompatible selon la revendication 7, caractérisé en ce que les groupements
- 35

Z, identiques ou différents, sont des acides aminés, des acides gras, des alcools gras, des céramides, ou des dérivés de ceux-ci, ou encore des séquences nucléotidiques d'adressages.

5

9) Polymère biocompatible selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que les groupements Z, identiques ou différents, sont des agents thérapeutiques ou de diagnostic.

10

10) Polymère biocompatible selon la revendication 9, caractérisé en ce que le groupement Z est choisi parmi un anti-inflammatoire, un anti-microbien, un antibiotique, une enzyme, un facteur de croissance.

15

11) Polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les groupements X, Y et Z sont fixés directement sur le monomère A ou bien fixés les uns aux autres, l'un seulement étant fixé au monomère A.

20

12) Polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 5 à 11, caractérisé en ce que les groupements Z sont fixés par covalence directement sur les monomères A ou fixés par covalence sur les groupements X et/ou Y.

25

13) Polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 5 à 11, caractérisé en ce que les groupements Z sont conjugués aux polymères de formule (I) par des liaisons autres que covalentes.

30

14) Polymère biocompatible selon la revendication 13, caractérisé en ce que les groupements

35

Z sont conjugués aux polymères de formule (I) par des interactions ioniques ou hydrophiles.

- 5 15) Composition pharmaceutique ou de diagnostic, caractérisée en ce qu'elle renferme au moins un polymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 associé dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 10 16) Composition pharmaceutique selon la revendication 15, caractérisée en ce que le polymère biocompatible et le véhicule pharmaceutiquement acceptable sont associés sous une forme permettant l'administration locale, intra-veineuse, intra-
15 artérielle, intra musculaire, intra péritonéenne, intra oculaire, dans le liquide céphalorachidien ou directement dans le système nerveux central, ou encore par voie orale, per os, per cutanée, sous cutanée, topique, dans tous les compartiments liquidiens de
20 l'organisme, ou éventuellement une combinaison de celles-ci.
- 17) Composition selon l'une des revendications 15 à 16, caractérisée en ce que son
25 dosage permet une administration de 0,001 à 1 milligramme de polymère par centimètre carré ou de 0,005 à 1 milligramme de polymère par centimètre cube de tissu à traiter.
- 30 18) Composition selon l'une des revendications 15 à 16, caractérisée en ce qu'elle contient entre 0,01 et 10 milligramme de polymère par millilitre de solution physiologique de dissolution.
- 35 19) Composition selon l'une des revendications 15 à 16, caractérisée en ce que son

dosage permet une administration par voie systémique, intra-péritonéale, intra oculaire, dans le liquide céphalorachidien, dans le liquide intracochléaire ou dans tous fluides péri ou intra tissulaires, de 0,1 et
5 100 milligrammes de polymère par kilogramme de poids d'homme ou d'animal à traiter.

20) Composition selon l'une des revendications 15 à 16, caractérisée en ce que son
10 dosage permet une administration par voie intramusculaire, comprise entre 0,2 et 500 milligrammes de polymère par kilogramme de poids d'homme ou d'animal à traiter, et de préférence entre 1 et 50 mg par kg.

15 21) Composition selon l'une des revendications 15 à 16, caractérisée en ce que son dosage permet une administration per os comprise entre 1 et 5000 milligrammes de polymère par kilogramme de poids d'homme ou d'animal à traiter, et de préférence
20 entre 10 et 500 mg par kg.

22) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 15 à 21, caractérisée en ce qu'elle est dépourvue d'activité anticoagulante
25 significative.

23) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 15 à 22, pour être utilisée dans un procédé de stabilisation et de
30 potentialisation des facteurs de croissance présentant une affinité pour l'héparine.

24) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 15 à 23, pour être
35 utilisée dans un procédé de protection des facteurs de

croissance présentant une affinité pour l'héparine contre des agents protéolytiques comme la trypsine.

5 25) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 15 à 21, pour être utilisée dans un procédé d'inhibition des activités protéasiques impliquées dans le processus inflammatoire.

10 26) Composition pharmaceutique caractérisé en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour le traitement et/ou la prévention des lésions et souffrances des tissus ou des organes.

15 27) Composition pharmaceutique selon la revendication 26, pour le traitement et/ou la prévention des lésions des tissus musculaires, nerveux et du tractus digestif.

20 28) Composition pharmaceutique selon la revendication 26 pour la cicatrisation cutanée.

 29) Composition pharmaceutique selon la revendication 26 pour la cicatrisation de la cornée.

25 30) Composition pharmaceutique selon la revendication 26 pour la cicatrisation de l'os plat.

 31) Composition pharmaceutique selon la revendication 26 pour la cicatrisation de l'os long.

30 32) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour le traitement et/ou la prévention d'une
35 inflammation.

33) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour être utilisée dans un procédé de régulation de l'homéostasie de la masse et de la fonctionnalité des tissus et des organes.

34) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour être utilisée dans un procédé de régénération, de protection, de préservation et de vieillissement tissulaire et cellulaire *in vivo* et *ex vivo*.

35) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou en association avec la SOD, pour le traitement et/ou la prévention des effets délétères des ischémies, des radiations ionisantes et des produits oxydants induits lors de pathologies ou de stress ou encore apportés dans l'alimentation.

36) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour être utilisée dans un procédé de préservation et de protection contre les ischémies.

37) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour le traitement et/ou la prévention des pathologies associées à une hypoxie, à une dégénérescence cellulaire comme les neuropathies, les

myopathies, les hépatopathies, les néphropathies, les cardiopathies, et aux peroxydations des molécules comme les lipides.

5 38) Composition pharmaceutique caractérisée
en ce qu'elle comprend au moins un polymère
biocompatible selon l'une quelconque des revendications
1 à 14 pour la conservation des tissus et organes et
prothèses.

10 39) Composition pharmaceutique caractérisée
en ce qu'elle comprend au moins un polymère
biocompatible selon l'une quelconque des revendications
1 à 14 pour le traitement et/ou la prévention des
15 maladies cardiaques et nerveuses.

 40) Composition pharmaceutique caractérisée
en ce qu'elle comprend au moins un polymère
biocompatible selon l'une quelconque des revendications
20 1 à 14 pour le traitement et/ou la prévention des
maladies associées à une croissance anarchique des
cellules et aux processus pathologiques en relation avec
une angiogenèse.

25 41) Composition pharmaceutique caractérisée
en ce qu'elle comprend au moins un polymère
biocompatible selon l'une quelconque des revendications
1 à 14 pour le traitement et/ou la prévention des effets
délétères des radiations ionisantes.

30 42) Composition pharmaceutique caractérisée
en ce qu'elle comprend au moins un polymère
biocompatible selon l'une quelconque des revendications
1 à 14 pour le traitement et/ou la prévention des
35 fibroses.

43) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour être utilisée dans un procédé de régulation de la prolifération des cellules mésenchymateuses comme les cellules musculaires lisses, les fibroblastes ou les cellules hépatiques et de régulation de la qualité du type de collagène qu'elles sécrètent.

44) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour le traitement et/ou la prévention des pathologies pulmonaires rénales, hépatiques, cardiaques, vasculaires, dermatologiques, des greffes et de leur intégration fonctionnelle, des dérives multiples liées aux parasistismes.

5 45) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour le traitement et/ou la prévention des lésions et souffrances induites par un stress oxydatif et les agents oxydants.

10 46) Composition caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou en association avec un autre composé pour la préservation d'aliments ou de nutriments contenant naturellement des antioxydants ou auxquels ont été ajoutés des agents antioxydants comme la SOD animale ou végétale.

15 47) Composition caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une

quelconque des revendications 1 à 14 et de la SOD animale ou végétale.

48) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour le traitement et/ou la prévention des agressions, de la souffrance ou de la dégénérescence des tissus nerveux.

49) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour le traitement et/ou la prévention du vieillissement.

50) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour le traitement et/ou la prévention des souffrances du coeur, du cerveau, du système nerveux central.

51) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour le traitement et/ou la prévention des lésions de la moelle épinière ou de la rétine.

52) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour le traitement et/ou la prévention des insuffisances respiratoires

associées à la fatigue du diaphragme, comme la dystrophie musculaires.

53) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour le traitement et/ou la prévention des effets délétères associés au diabète comme dans les rétinopathies diabétiques.

54) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour le traitement et/ou la prévention de la lèpre.

55) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour le traitement et/ou la prévention du choc endotoxique.

56) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour le traitement et/ou la prévention d'une invasion par un agent pathogène, tel qu'un agent viral, microbien, parasitaire, prion.

57) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour être utilisée dans un procédé de radiothérapie pour le traitement des cancers.

58) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour la prévention et/ou le traitement des effets induits par les rayons ultraviolets

59) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, seul ou associé à la SOD, pour la prévention et/ou le traitement de l'hypertension.

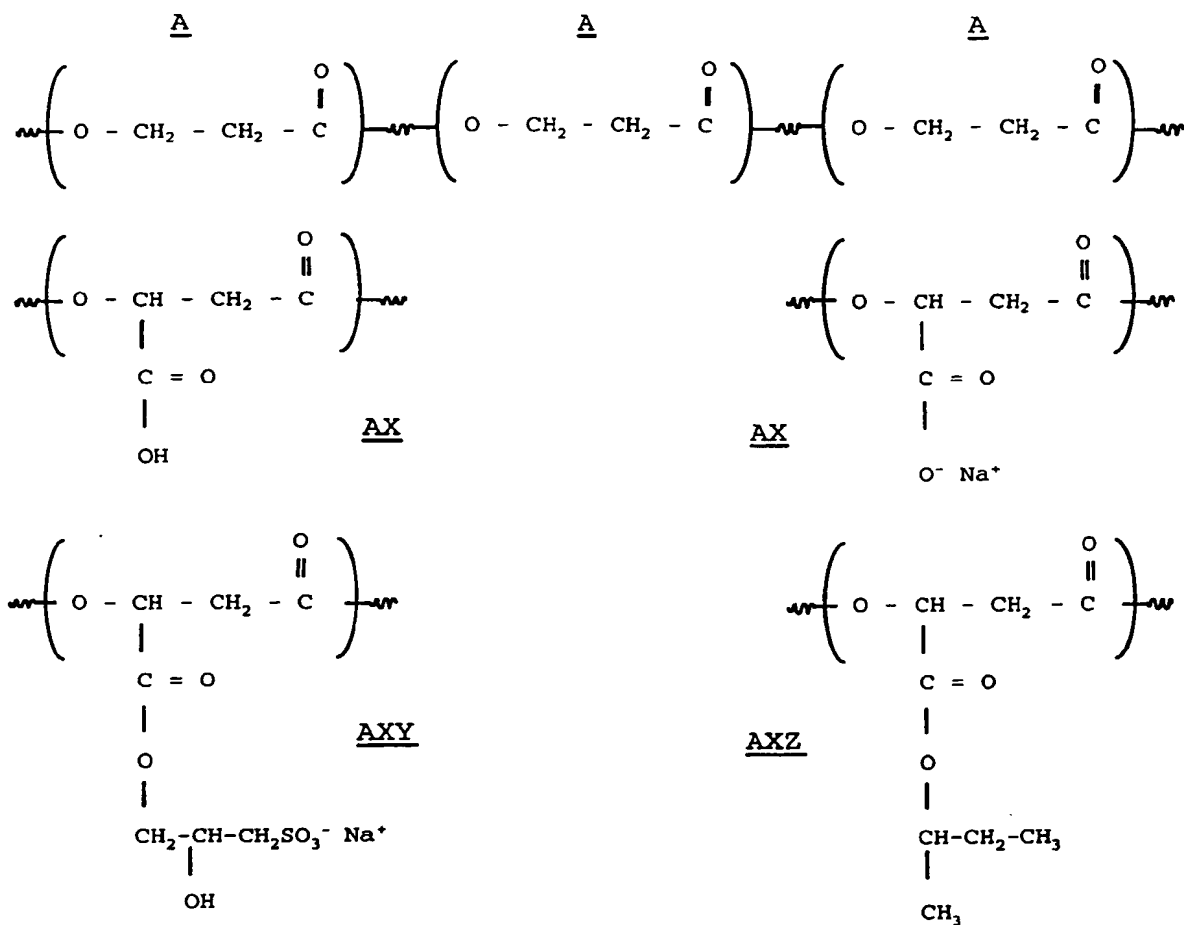
5 60) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polymère biocompatible selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour la prévention et/ou le traitement des lésions et souffrances tissulaires rencontrées en traumatologie.

10 61) Utilisation d'un biopolymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour véhiculer un agent actif au niveau de tissus lésés.

62) Utilisation selon la revendication 61, caractérisée en ce que l'agent actif est un agent thérapeutique ou de diagnostic.

1/30

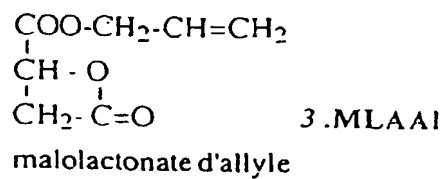
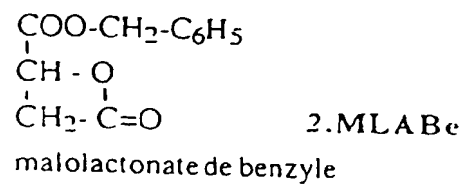
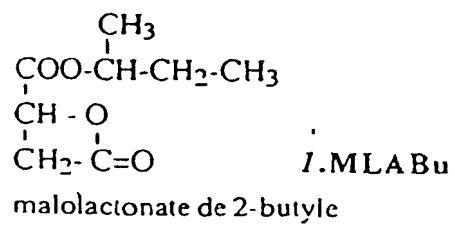
Fig.1



Les acides -β-malique

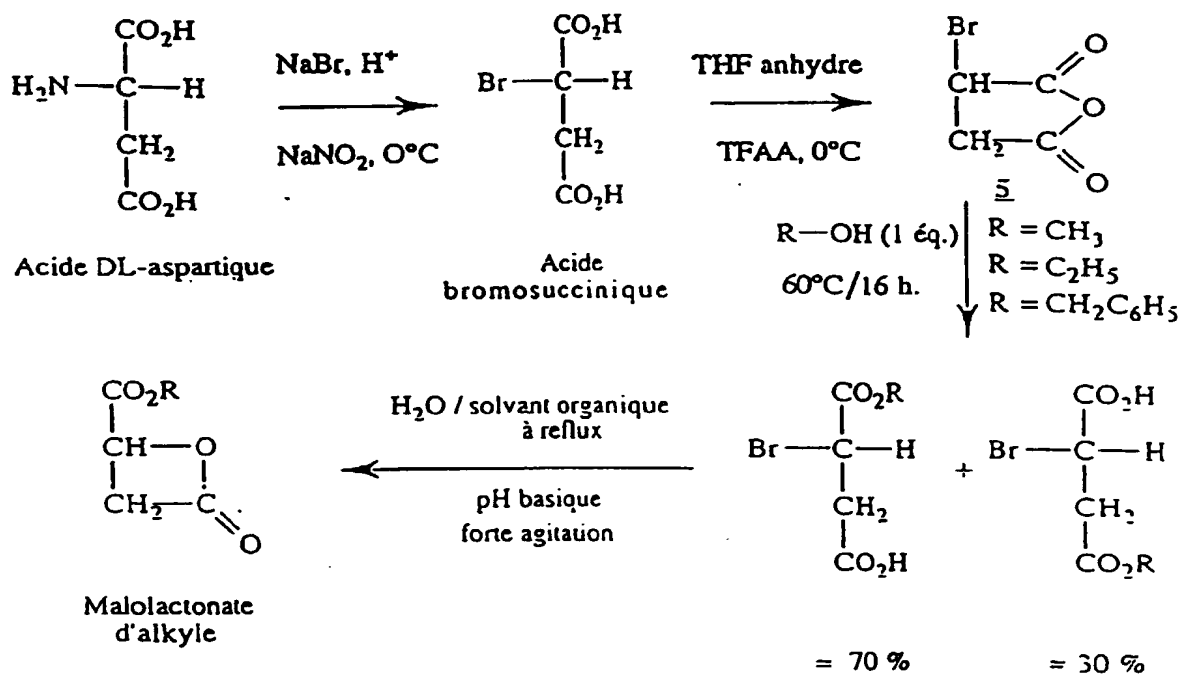
2/30

Fig.2

Structure des 3 β -lactones.

3/30

FIG.3



4/30

Fig.4

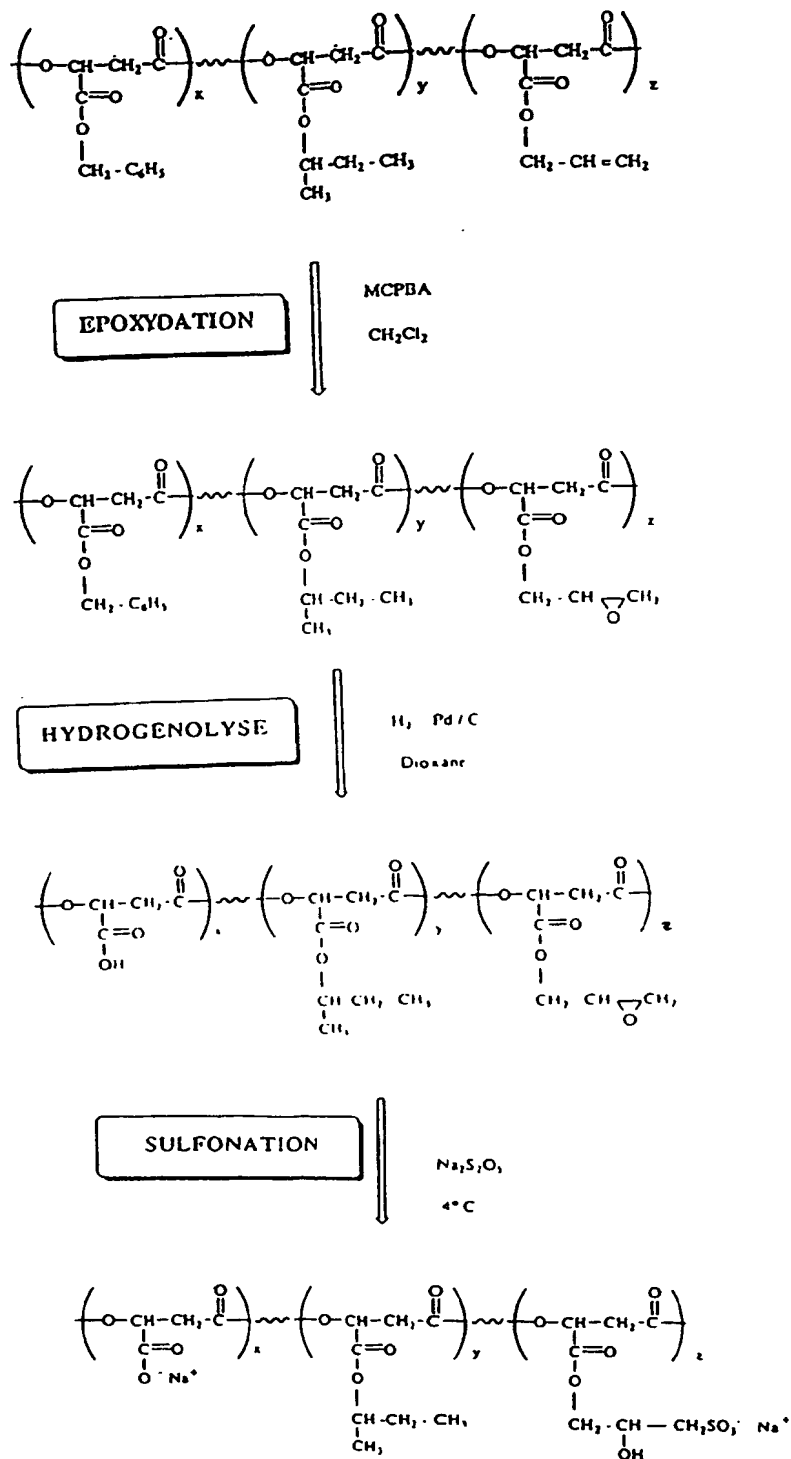
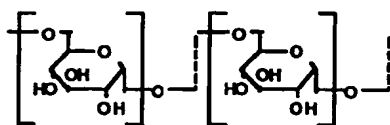


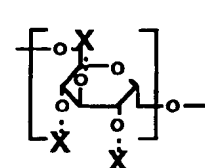
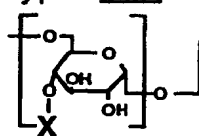
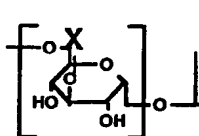
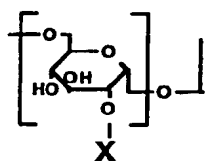
Schéma récapitulatif de la synthèse de dérivés du poly(acide β -malique).

5/30

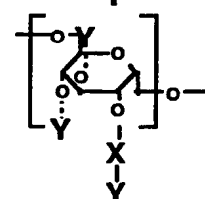
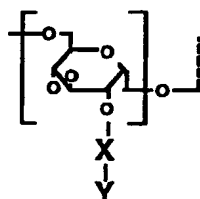
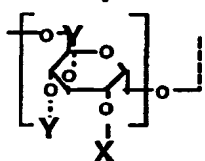
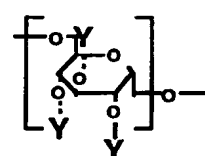
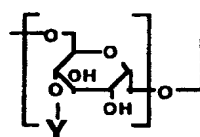
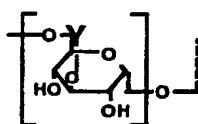
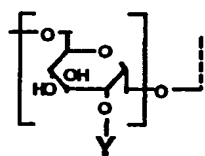
Figure 5
Monomères A



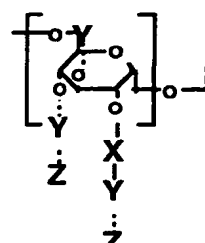
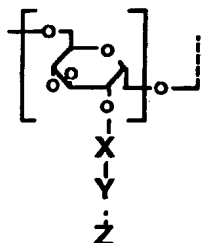
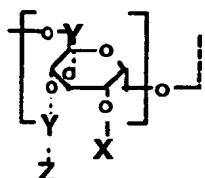
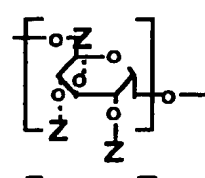
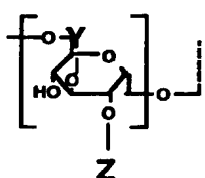
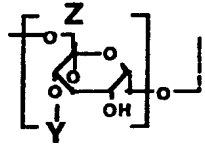
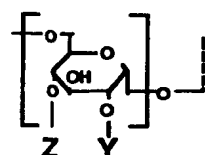
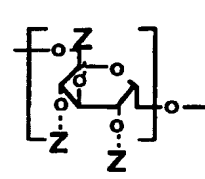
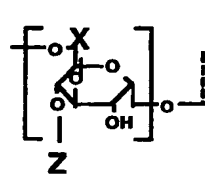
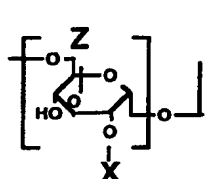
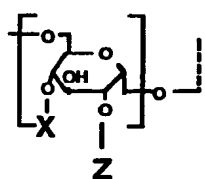
Monomères de type A-X



Monomères de type A-Y



Monomères de type A-Z



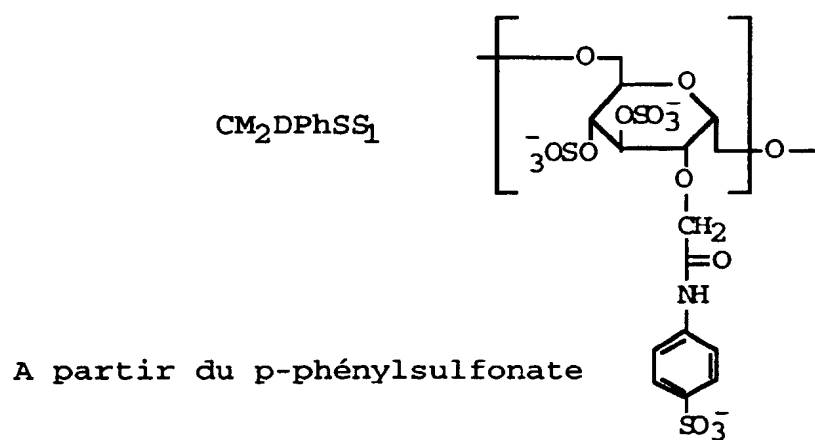
6/30

Figure 6

| Référence | | X = % COO ⁻ | Y = % SO ₃ ⁻ | Z |
|-----------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---|
| RGTA 1000 | CM ₁ D | 48,98 | 0 | 0 |
| RGTA 1001 | CM ₁ DS _{0,5} | 48,5 | 13,1 | 0 |
| RGTA 1002 | CM ₁ DS _{0,75} | 44,7 | 25,3 | 0 |
| RGTA 1003 | CM ₁ DS ₁ | 40,9 | 40,6 | 0 |
| RGTA 1004 | CM ₁ DS _{1,5} | 31,7 | 56,5 | 0 |
| RGTA 1005 | CM ₁ DS ₂ | 26,3 | 82,3 | 0 |
| RGTA 1006 | CM ₁ Dsex | 19,1 | 94,4 | 0 |
| RGTA 1007 | CM ₂ D | 91,8 | 0 | 0 |
| RGTA 1008 | CM ₂ DS _{0,5} | 84,9 | 18,4 | 0 |
| RGTA 1009 | CM ₂ DS _{0,75} | 63,7 | 30,3 | 0 |
| RGTA 1010 | CM ₂ DS ₁ | 61,1 | 37,3 | 0 |
| RGTA 1011 | CM ₂ DS _{1,5} | 57,8 | 44,6 | 0 |
| RGTA 1012 | CM ₂ DS ₂ | 55,0 | 55,7 | 0 |
| RGTA 1013 | CM ₂ Dsex | 22,6 | 58,5 | 0 |
| RGTA 1014 | CM ₃ D | 118,3 | 0 | 0 |
| RGTA 1015 | CM ₃ DS _{0,5} | 102,7 | 15,6 | 0 |
| RGTA 1016 | CM ₃ DS _{0,75} | 70,9 | 36,5 | 0 |
| RGTA 1017 | CM ₃ DS ₁ | 87,3 | 42,0 | 0 |
| RGTA 1018 | CM ₃ DS _{1,5} | 71,2 | 55,0 | 0 |
| RGTA 1019 | CM ₃ DS ₂ | 68,9 | 57,3 | 0 |
| RGTA 1020 | CM ₄ D | 154,0 | 0 | 0 |
| RGTA 1021 | CM ₄ DS _{0,5} | 114,8 | 8,9 | 0 |
| RGTA 1022 | CM ₄ DS ₁ | 104,9 | 24,6 | 0 |
| RGTA 1023 | CM ₄ DS ₂ | 72,2 | 51,8 | 0 |
| RGTA 0040 | DS commercial | 0 | 97,6 | 0 |
| RGTA 1024 | DS _{0,5} équiv | 0 | 103,0 | 0 |
| RGTA 1025 | DS _{0,25} équiv | 0 | 41,4 | 0 |
| RGTA 1026 | DS _{0,125} équiv | 0 | 23,5 | 0 |

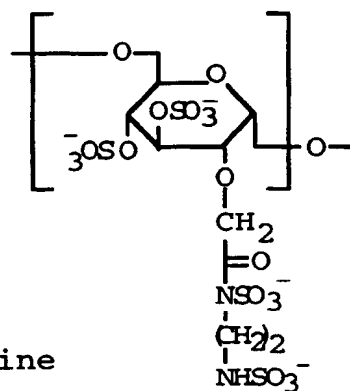
7/30

Figure 7



8/30

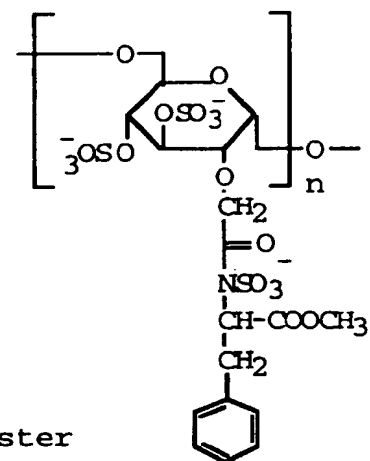
Figure 8

CM₂DES₁

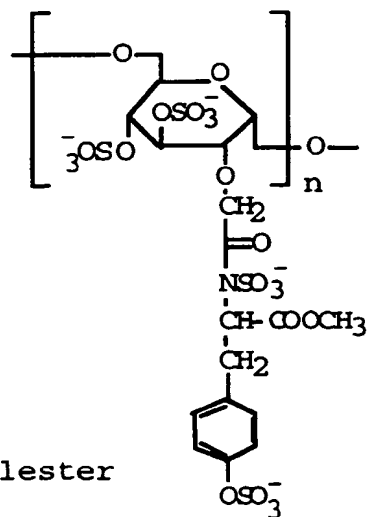
A partir de l'éthylènediamine

9/30

Figure 9

CM₃DPheS₂

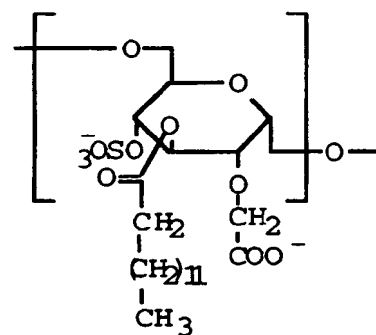
A partir de la phénylalanine méthylester

CM₃DTyrS₂

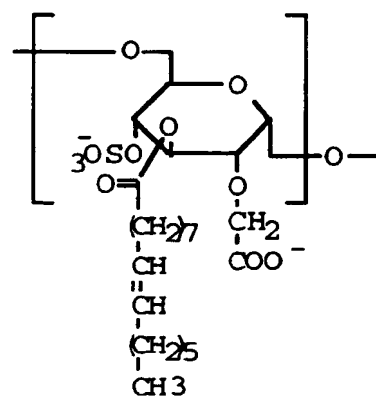
A partir de la tyrosine méthylester

10/30

Figure 10

 $CM_1DPalms_1$ 

A partir de l'acide palmitique (C16)

 $CM_1DOleicS_1$ 

A partir du chlorure oléique (C18;9)

11/30

Figure 11

| Référence | polymères | Activité anti-coagulante en UI | Référence | polymères | Activité anti-coagulante en UI |
|-----------|------------------------------------|--------------------------------|-----------|--------------------------------------|--------------------------------|
| Hép | Héparine | 176 | RGTA 1013 | CM ₂ D _{Sex} | <50 |
| RGTA 2010 | P _{coo-} | <50 | RGTA 1014 | CM ₃ D | <50 |
| RGTA 2011 | P _{1S} | <50 | RGTA 1015 | CM ₃ D _{S0,5} | <50 |
| RGTA 2012 | P _{2S} | <50 | RGTA 1016 | CM ₃ D _{S1} | <50 |
| RGTA 1000 | CM ₁ D | <50 | RGTA 1017 | CM ₃ D _{S1,5} | <50 |
| RGTA 1001 | CM ₁ D _{S0,5} | <50 | RGTA 1019 | CM ₃ D _{S2} | <50 |
| RGTA 1002 | CM ₁ D _{S0,75} | <50 | RGTA 1110 | CM ₂ D _{PhSS1} | <50 |
| RGTA 1003 | CM ₁ D _{S1} | <50 | RGTA 1111 | CM ₂ D _{ES1} | <50 |
| RGTA 1004 | CM ₁ D _{S1,5} | <50 | RGTA 1112 | CM ₂ D _{PhES2} | <50 |
| RGTA 1005 | CM ₁ D _{S2} | <50 | RGTA 1113 | CM ₃ D _{TyrS2} | <50 |
| RGTA 1006 | CM ₁ D _{Sex} | <50 | RGTA 1114 | CM ₁ D _{Palms1} | <50 |
| RGTA 1007 | CM ₂ D | <50 | RGTA 1115 | CM ₁ D _{OLéicS1} | <50 |
| RGTA 1008 | CM ₂ D _{S0,5} | <50 | RGTA 0040 | DS commercial | <50 |
| RGTA 1009 | CM ₂ D _{S0,75} | <50 | RGTA 1024 | DS _{0,5} équiv | <50 |
| RGTA 1010 | CM ₂ D _{S1} | <50 | RGTA 1025 | DS _{0,25} équiv | <50 |
| RGTA 1011 | CM ₂ D _{S1,5} | <50 | RGTA 1026 | DS _{0,125} équiv | <50 |
| RGTA 1012 | CM ₂ D _{S2} | <50 | RGTA 0001 | Dextran T40 | <50 |

Activités anticoagulantes des polymères

12/30

Figure 12

| Traitement | 20° C | 20° C | 20° C | 20° C | 37° C | 37° C |
|--|--------|--------|---------|----------|--------|---------|
| Valeur de l'ED50 à | 0 jour | 1 jour | 7 jours | 15 jours | 1 jour | 7 jours |
| FGF1 seul | 6 | 8 | 14 | >20 | 7 | >20 |
| FGF1 +Héparine | 0,8 | 1,2 | 6 | 16 | 1,4 | 15 |
| FGF1 + Dextran T40 | 6 | 10 | >20 | >20 | 7 | >20 |
| FGF1 + DS commercial | 6 | 8 | >20 | >20 | 7 | >20 |
| FGF1 + DS _{0,5} équiv | 6 | 8 | >20 | >20 | 7 | >20 |
| FGF1 + DS _{0,125} équiv | 6 | 10 | >20 | >20 | 7 | >20 |
| Pcoo- | 8 | >20 | >20 | >20 | 18 | >20 |
| P1S | 3 | 6 | 10 | 17 | 5 | 15 |
| P2S | 1 | 3 | 9 | 14 | 3 | 11 |
| FGF1 + CM ₁ D | 6 | 9 | >20 | >20 | 7 | >20 |
| FGF1 + CM ₂ D | 6 | 7 | >20 | >20 | 7 | >20 |
| FGF1 + CM ₁ DS ₂ | 0,5 | 1,1 | 6 | 17 | 2,1 | 16 |
| FGF1 + CM ₂ DS ₂ | 2 | 8 | 15 | >20 | 5 | >20 |
| FGF1 + CM ₂ DPhS | 8 | 15 | >20 | >20 | 8 | >20 |
| FGF1 + CM ₂ DPhSS ₁ | 2 | 6 | 18 | >20 | 3 | 14 |
| FGF1 + CM ₂ DES ₁ | 1 | 3 | 8 | 17 | 9 | >20 |
| FGF1 + CM ₂ DPheS ₂ | 0,9 | 2 | 4 | 13 | 8 | 17 |
| FGF1 + CM ₃ DTyrS ₂ | 3 | 5 | >20 | >20 | 9 | >20 |
| FGF1 + CM ₁ DPalmS ₁ | 4 | 4 | 16 | >20 | 14 | >20 |

Effets stabilisateurs des polymères sur le FGF1

13/30

Figure 13

| Références polymères | Conditions | concentrations (µg/ml) | ED50 FGF1 (ng/ml) | ED50 FGF2 (pg/ml) |
|----------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| | FGF seul | 0 | 8 | 56 |
| | héparine | 1 | 2 | 35 |
| RGTA 2010 | Pcoo- | 100 | 4 | 56 |
| RGTA 2011 | P1S | 100 | 2.5 | 38 |
| RGTA 2012 | P2S | 100 | 4 | 41 |
| RGTA 0040 | DS commercial | 100 | 3 | 30 |
| RGTA 1024 | DS _{0,5} équiv | 100 | 4 | 36 |
| RGTA 1026 | DS _{0,125} équiv | 100 | 6 | 48 |
| RGTA 1000 | CM ₁ D | 10 | 12 | 168 |
| RGTA 1007 | CM ₂ D | 10 | 16 | 297 |
| RGTA 1005 | CM ₁ DS ₂ | 10 | 1 | 40 |
| RGTA 1012 | CM ₂ DS ₂ | 10 | 1,5 | 31 |
| RGTA 1110 | CM ₂ DPhS ₁ | 10 | 8 | 53 |
| RGTA 1111 | CM ₂ DES ₁ | 10 | 5 | 45 |
| RGTA 1112 | CM ₂ DPheS ₂ | 10 | 3 | 38 |
| RGTA 1113 | CM ₃ DTyrS ₂ | 10 | 2 | 30 |
| RGTA 1114 | CM ₁ DPalmS ₁ | 10 | 9 | 42 |

Effets potentialisateurs sur le FGF1 et le FGF2

14/30

Figure 14

| concentration ($\mu\text{g/ml}$) | polymère + FGF2 | | | | polymère + FGF1 | | | | polymère + TGF β | | | |
|---------------------------------------|-----------------|------|----|------|-----------------|----|-----|-----|------------------------|----|----|-----|
| | 500 | 50 | 5 | 0.5 | 500 | 50 | 5 | 0.5 | 100 | 50 | 5 | 0.5 |
| FGF2 seul | 100 | | | | 100 | | | | 100 | | | |
| FGF2 + trypsine | <1 | | | | <1 | | | | <1 | | | |
| héparine (10 $\mu\text{g/ml}$) | 100 | | | | 100 | | | | <1 | | | |
| trypsine + P _{COO} - | 14.4 | 24.4 | 18 | 22 | 29.7 | 25 | 18 | 16 | 5 | <1 | <1 | <1 |
| trypsine + P1S | 61.3 | 100 | 97 | 87.5 | 85 | 96 | 100 | 63 | 58 | 84 | 70 | 22 |
| trypsine + P2S | 59 | 68 | 65 | 57 | 72 | 84 | 91 | 49 | 33 | 75 | 92 | 67 |

Pourcentage de FGF1 et de FGF2 et de TGF β non dégradé par la trypsine
en présence des polymères poly acide B malique

15/30

Figure 15

| % de protection des facteurs | | | % de protection des facteurs | | |
|------------------------------------|------|-------------|-----------------------------------|------|-------------|
| Polymères | FGF2 | TGF β | Polymères | FGF2 | TGF β |
| Héparine | 100 | 15 | CM ₃ D | 22 | 23 |
| CM ₁ D | 20 | 25 | CM ₃ DS _{0,5} | 29 | 32 |
| CM ₁ DS _{0,5} | 74 | 65 | CM ₃ DS ₁ | 32 | 38 |
| CM ₁ DS _{0,75} | 77 | 71 | CM ₃ DS _{1,5} | 35 | 40 |
| CM ₁ DS ₁ | 80 | 75 | CM ₃ DS ₂ | 40 | 47 |
| CM ₁ DS _{1,5} | 96 | 78 | CM ₂ DPhSS1 | 76 | 67 |
| CM ₁ DS ₂ | 100 | 80 | CM ₂ DES1 | 81 | 71 |
| CM ₁ Dsex | 100 | 81 | CM ₂ DPhS2 | 67 | 56 |
| CM ₂ D | 20 | 25 | CM ₃ DTyrS2 | 83 | 54 |
| CM ₂ DS _{0,5} | 87 | 74 | CM ₁ DPalms1 | 67 | 74 |
| CM ₂ DS _{0,75} | 90 | 77 | CM ₁ DOLéicS1 | 58 | 72 |
| CM ₂ DS ₁ | 97 | 80 | DS commercial | 87 | 12 |
| CM ₂ DS _{1,5} | 95 | 79 | DS _{0,5} équiv | 66 | 9 |
| CM ₂ DS ₂ | 90 | 80 | DS _{0,125} équiv | 51 | 10 |
| CM ₂ Dsex | 88 | 74 | Dextran T40 | 6 | 5 |

Pourcentage de FGF2 et de TGF β non dégradé par la trypsine en présence des polymères dérivés de dextrans

16/30

Figure 16

| Polymères | IC 50 en mg/ml | | Polymères | IC 50 en mg/ml | |
|------------------------------------|----------------|----------|-----------------------------------|----------------|----------|
| | Elastase | plasmine | | Elastase | plasmine |
| Héparine | 1,8 | 1 | CM ₂ DSex | 5 | 0,07 |
| Pcoo- | 100 | 53 | CM ₃ D | >100 | >100 |
| P1S | 2 | 0,98 | CM ₃ DS _{0,5} | 8 | 6 |
| P2S | 4,7 | 0,82 | CM ₃ DS ₁ | 6 | 6 |
| CM ₁ D | >100 | >100 | CM ₃ DS _{1,5} | 4 | 6 |
| CM ₁ DS _{0,5} | 37 | 8 | CM ₃ DS ₂ | 2 | 1,5 |
| CM ₁ DS _{0,75} | 24 | 2,5 | CM ₂ DPhS1 | 12 | 2,4 |
| CM ₁ DS ₁ | 20 | 1 | CM ₂ DES1 | 18 | 3,8 |
| CM ₁ DS _{1,5} | 3 | 0,15 | CM ₂ DPhS2 | 4 | 0,3 |
| CM ₁ DS ₂ | 1 | 0,08 | CM ₃ DTyrS2 | 1,8 | 0,15 |
| CM ₁ DSex | 1 | 0,035 | CM ₁ DPalmS1 | 1,4 | 6 |
| CM ₂ D | >100 | >100 | CM ₁ DOLéicS1 | 2 | 9 |
| CM ₂ DS _{0,5} | 7 | 1 | DS commercial | >100 | >100 |
| CM ₂ DS _{0,75} | 5 | 0,7 | DS _{0,5} équiv | >100 | >100 |
| CM ₂ DS ₁ | 2 | 0,5 | DS _{0,25} équiv | >100 | >100 |
| CM ₂ DS _{1,5} | 2 | 0,1 | DS _{0,125} équiv | >100 | >100 |
| CM ₂ DS ₂ | 2 | 0,05 | Dextran T40 | >100 | >100 |

Effets inhibiteurs des polymères sur les activités
de l'élastase leucocytaire et de la plasmine

17/30

Figure 17

| Produits | doses µg/ml | effets en % du témoin | Produits | doses µg/ml | effets en % du témoin |
|---------------------------|----------------|-----------------------------|-------------------------|----------------|-----------------------------|
| Témoin | | 100 | CM1DS1 | 50 | 134 |
| Dextran T40 | 10 | <100 | | 100 | 189 |
| | 50 | <100 | | 200 | 231 |
| | 100 | <100 | CM2D | 50 | <100 |
| | 200 | <100 | | 100 | <100 |
| Héparine | 10 | <100 | CM2DS2 | 20 | 143 |
| | 50 | 120 | | 50 | 138 |
| | 100 | <100 | | 100 | 191 |
| | 200 | <100 | | 200 | 213 |
| DS commercial | 100 | 112 | CM3D | 50 | <100 |
| | 200 | 124 | | 100 | <100 |
| DS _{0,5} équiv | 100 | <100 | CM3DS2 | 50 | 136 |
| | 200 | 121 | | 100 | 147 |
| DS _{0,25} équiv | 100 | 109 | | 200 | 178 |
| | 200 | 125 | CM ₂ DPhS1 | 50 | 115 |
| DS _{0,125} équiv | 100 | <100 | | 100 | 178 |
| | 200 | 129 | | 200 | 189 |
| Pcoo- | 50 | <100 | CM ₂ DES1 | 50 | 137 |
| | 100 | <100 | | 100 | 144 |
| | 200 | <100 | | 200 | 168 |
| P1S | 50 | 150 | CM ₂ DPheS2 | 50 | 152 |
| | 100 | 199 | | 100 | 196 |
| | 200 | 135 | | 200 | 154 |
| P2S | 50 | 152 | CM ₃ DTyrS2 | 50 | 167 |
| | 100 | 170 | | 100 | 241 |
| | 200 | 177 | | 200 | 203 |
| CM1D | 50 | <100 | CM ₁ DPalmS1 | 50 | 133 |
| | 100 | <100 | | 100 | 157 |
| | 200 | <100 | | 200 | 176 |

Pourcentages de régénération musculaire après injection de doses variables de polymères.

Figure 18

| Conditions expérimentales | Activité de la SOD en unités arbitraires |
|--|--|
| SOD témoin à pH = 7 | 100 |
| 50 microg/mL de CM1DS2 + SOD à pH = 7 | 132 |
| 250 microg/mL de CM1DS2 + SOD à pH = 7 | 165 |
| 500 microg/mL de CM1DS2 + SOD à pH = 7 | 196 |
| 50 microg/mL de CM3DTyrS2 + SOD à pH = 7 | 105 |
| 250 microg/mL de CM3DTyrS2 + SOD à pH = 7 | 122 |
| 500 microg/mL de CM3DTyrS2 + SOD à pH = 7 | 118 |
| SOD témoin à pH = 3 | 20 |
| 50 microg/mL de CM1DS2 + SOD à pH = 3 | 65 |
| 250 microg/mL de CM1DS2 + SOD à pH = 3 | 115 |
| 500 microg/mL de CM1DS2 + SOD à pH = 3 | 130 |
| 50 microg/mL de CM3DTyrS2 + SOD à pH = 3 | 85 |
| 250 microg/mL de CM3DTyrS2 + SOD à pH = 3 | 133 |
| 500 microg/mL de CM3DTyrS2 + SOD à pH = 3 | 150 |
| SOD témoin à pH = 11 | 30 |
| 50 microg/mL de CM1DS2 + SOD à pH = 11 | 40 |
| 250 microg/mL de CM1DS2 + SOD à pH = 11 | 95 |
| 500 microg/mL de CM1DS2 + SOD à pH = 11 | 122 |
| 50 microg/mL de CM3DTyrS2 + SOD à pH = 11 | 65 |
| 250 microg/mL de CM3DTyrS2 + SOD à pH = 11 | 93 |
| 500 microg/mL de CM3DTyrS2 + SOD à pH = 11 | 110 |

19/30

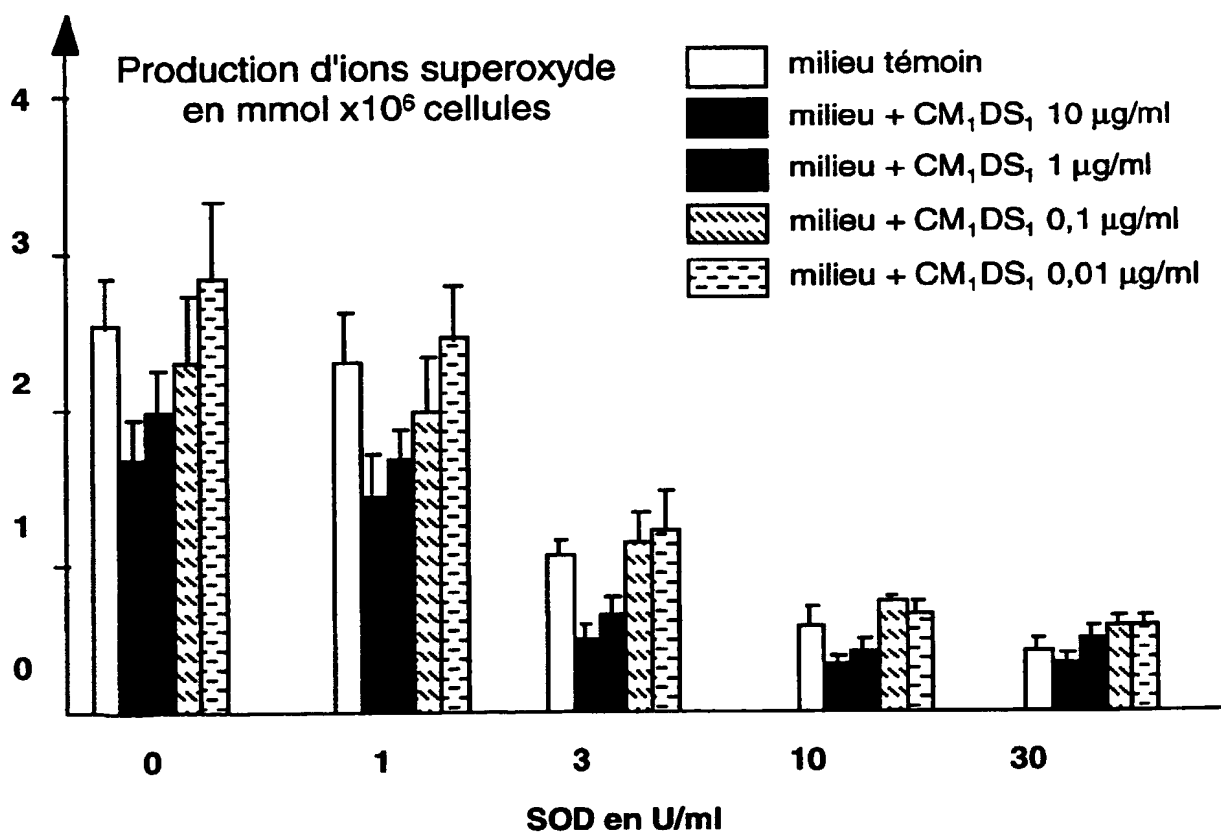
Figure 19

| Polymères à 100 mg/ml | % d'activité résiduelle | | Polymères à 100 mg/ml | % d'activité résiduelle | |
|------------------------------------|----------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------------------|----------------|
| | SOD + Trypsine | SOD à 60 °C | | SOD + Trypsine | SOD à 60 °C |
| Rien | 0 | 0 | CM ₃ D | 0 | 0 |
| Héparine | 60 | 45 | CM ₃ DS _{0,5} | 55 | 60 |
| Pcoo- | 0 | 0 | CM ₃ DS ₁ | 30 | 40 |
| P1S | 70 | 80 | CM ₃ DS ₂ | 10 | 20 |
| P2S | 80 | 80 | CM ₄ D | 0 | 0 |
| CM ₁ D | 0 | 0 | CM ₄ DS _{0,5} | 60 | 100 |
| CM ₁ DS _{0,5} | 90 | 70 | CM ₄ DS ₁ | 80 | 100 |
| CM ₁ DS _{0,75} | 100 | 70 | CM ₂ DPhSS1 | 50 | 60 |
| CM ₁ DS ₁ | 100 | 90 | CM ₂ DES1 | 60 | 80 |
| CM ₁ DS _{1,5} | 95 | 75 | CM ₂ DPheS2 | 80 | 100 |
| CM ₁ DS ₂ | 100 | 85 | CM ₃ DTyrS2 | 80 | 100 |
| CM ₁ Dsex | 90 | 90 | CM ₁ DPalmS1 | 75 | 60 |
| CM ₂ D | 0 | 0 | CM ₁ DOLéicS1 | 70 | 50 |
| CM ₂ DS _{0,5} | 90 | 55 | DS commercial | 20 | 10 |
| CM ₂ DS ₁ | 100 | 70 | DS _{0,5} équiv | 30 | 20 |
| CM ₂ DS _{1,5} | 70 | 85 | DS _{0,25} équiv | 20 | 0 |
| CM ₂ DS ₂ | 90 | 60 | DS _{0,125} équiv | 20 | 0 |
| CM ₂ Dsex | 70 | 40 | Dextran T40 | 0 | 0 |

Effets protecteurs des polymères sur la SOD après traitement par la
trypsine et choc thermique

20/30

Figure 20



Effets potentialisateurs de la SOD produite *in vitro*
par des monocytes activés

21/30

Figure 21

| Polymères | % d'activité résiduelle |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Dextran T40 | 100 |
| CM ₁ D | 100 |
| CM ₁ DS _{0,5} | 30 |
| CM ₁ DS ₁ | 10 |
| CM ₁ DS _{1,5} | 0 |
| CM ₁ DS ₂ | 0 |
| CM ₁ DSex | 20 |
| CM ₂ D | 100 |
| CM ₂ DS _{0,5} | 10 |
| CM ₂ DS ₁ | 0 |
| CM ₂ DS ₂ | 0 |
| CM ₂ DSex | 10 |
| CM ₂ DPhSS1 | 10 |
| CM ₂ DES1 | 0 |
| CM ₂ DPheS2 | 0 |
| CM ₃ DTyrS2 | 0 |
| CM ₁ DPalmS1 | 35 |
| CM ₁ DoléicS1 | 50 |
| DS commercial | 100 |

Effets inhibiteurs des RGTA sur la calpaïne

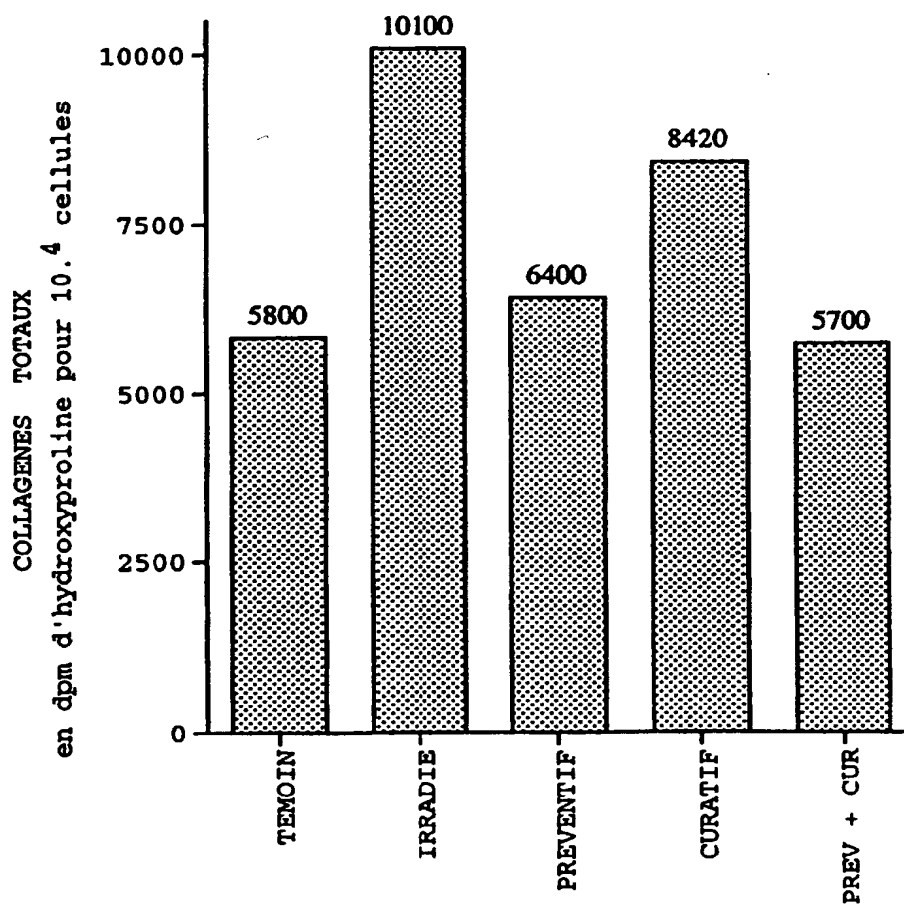
Figure 22

| % d'activité résiduelle | héparanase | % d'activité résiduelle | héparanase |
|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|
| Dextran T40 | 0 | CM ₃ D | 0 |
| CM ₁ D | 0 | CM ₃ DS _{0,5} | 90 |
| CM ₁ DS _{0,5} | 60 | CM ₃ DS ₁ | 100 |
| CM ₁ DS ₁ | 100 | CM ₃ DS ₂ | 100 |
| CM ₁ DS _{1,5} | 100 | CM ₄ D | 0 |
| CM ₁ DS ₂ | 100 | CM ₄ DS ₁ | 75 |
| CM ₁ Dsex | 100 | CM ₄ DS ₂ | 60 |
| CM ₂ D | 0 | CM ₂ DPhSS1 | 80 |
| CM ₂ DS _{0,5} | 80 | CM ₂ DES1 | 90 |
| CM ₂ DS ₁ | 100 | CM ₂ DPheS2 | 100 |
| CM ₂ DS ₂ | 100 | CM ₃ DTyrS2 | 100 |
| CM ₂ Dsex | 100 | CM ₁ DPalmS1 | 60 |
| DS commercial | 100 | Héparine | 100 |

Effets inhibiteurs des RGTA sur l'héparitinase

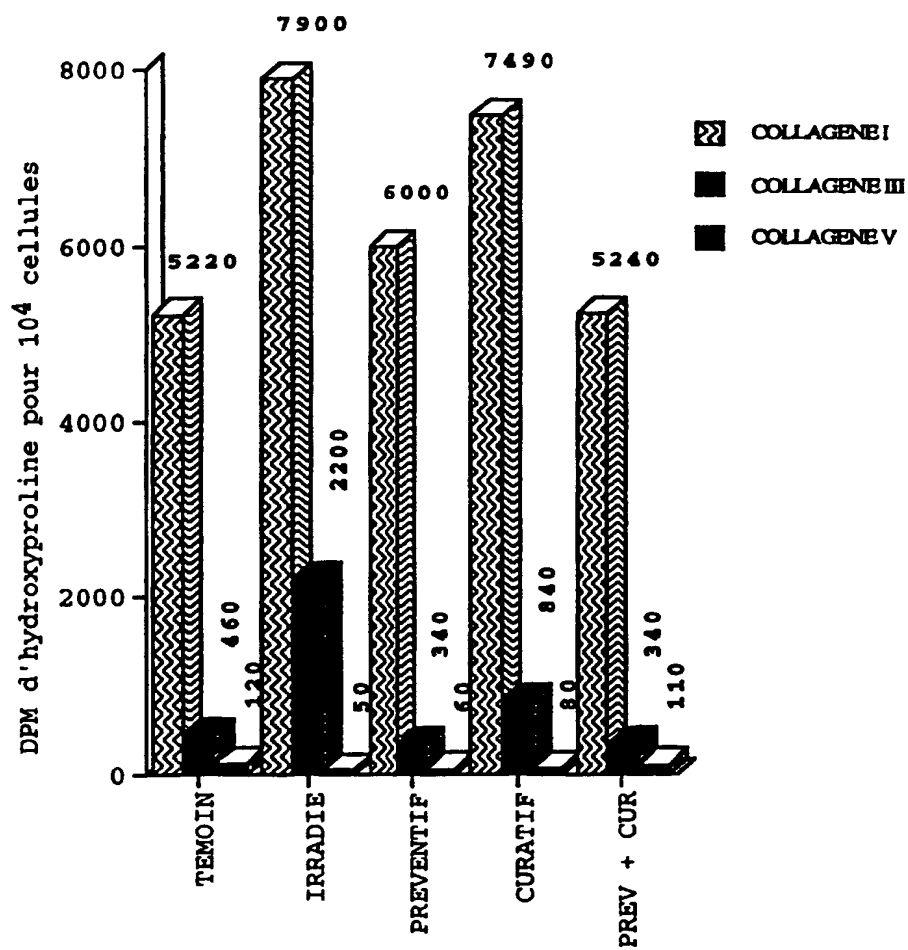
23/30

Figure 23



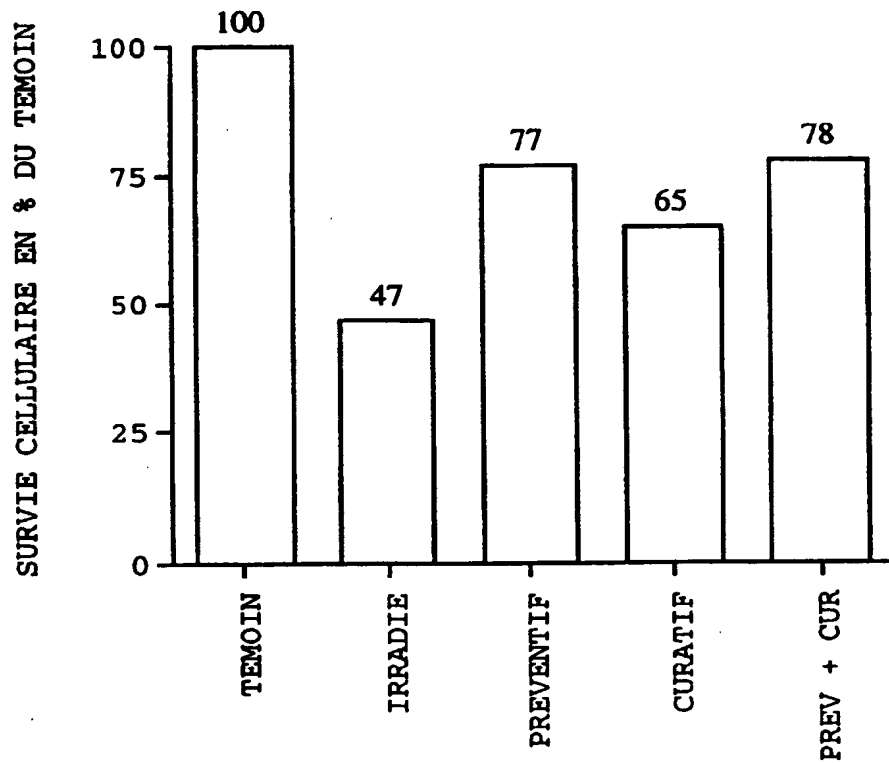
24/30

Figure 24



25/30

Figure 25



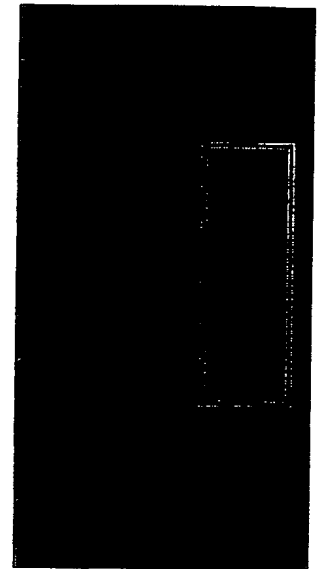
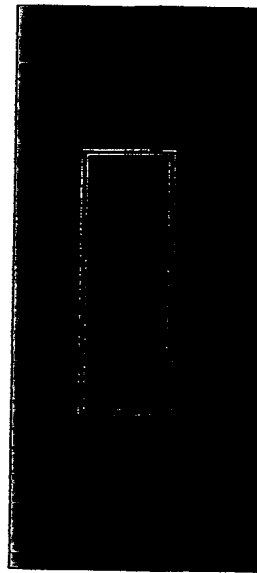
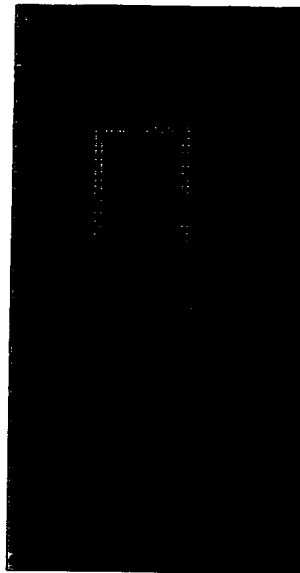
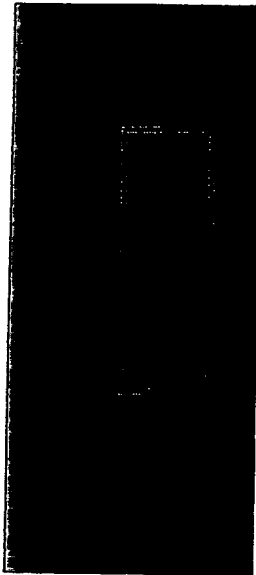
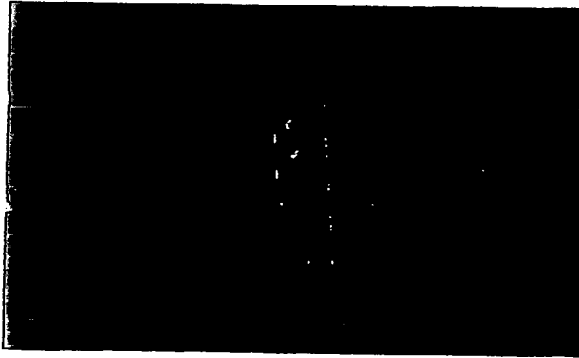
26/30

Figure 26

| | Inhibition de prolifé- ration | IC50 Inhibition en µg M | (%) synthèse collagène/ protéines | Collagène Type 1 en % du total 1+3+5 | Collagène Type 3 en % du total 1+3+5 | Collagène Type 5 en % du total 1+3+5 |
|------------------------------------|--|-------------------------------|--|--|--|--|
| Dextran T40 | 0 | | 17,1 | 58,7 | 36,9 | 4,4 |
| CM ₁ D | 0 | | 17,6 | 59,1 | 35,8 | 5,1 |
| CM ₁ DS ₂ | 85 | 0,62 | 11,4 | 58,1 | 21,8 | 14,1 |
| CM ₂ DS ₁ | 75 | 0,47 | 9,3 | 58,7 | 15,8 | 25,5 |
| CM ₂ DPheS ₂ | 85 | 1,12 | 12,1 | 68,5 | 18,5 | 13,0 |
| CM ₃ DTyrS ₂ | 80 | 0,95 | 10,8 | 65,5 | 20,6 | 13,9 |
| Héparine | 82 | 0,36 | 15,5 | 73,0 | 20,9 | 6,1 |

Action antifibrotique des RGTA sur des cellules musculaires lisses
d'aorte de porc

27/30
Fig.27



28/30
Fig.28

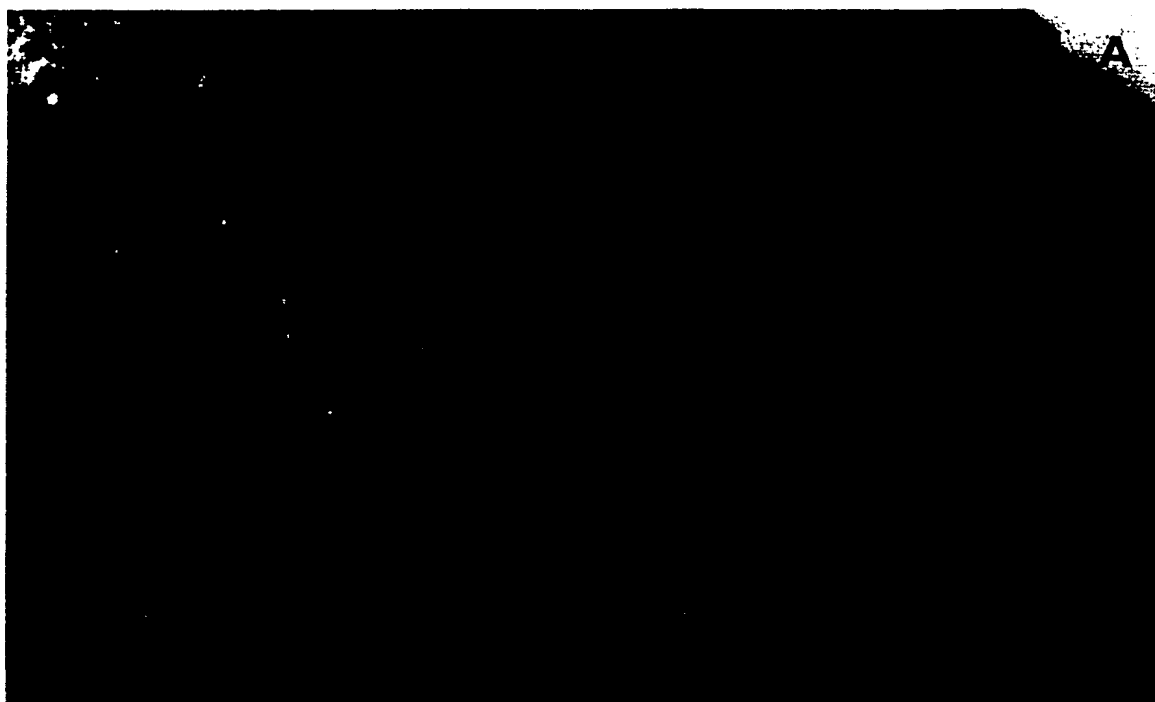
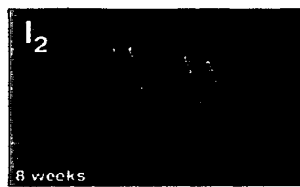
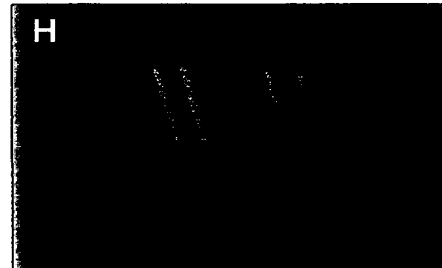
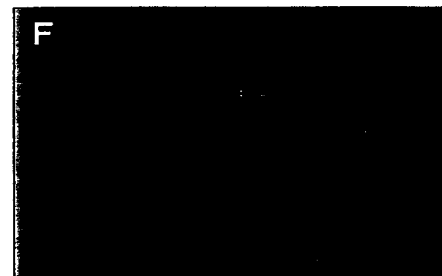
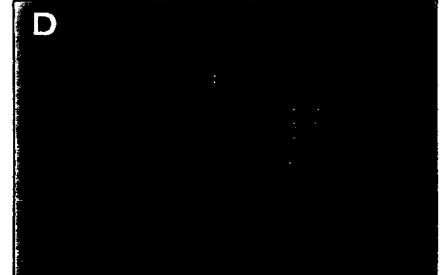
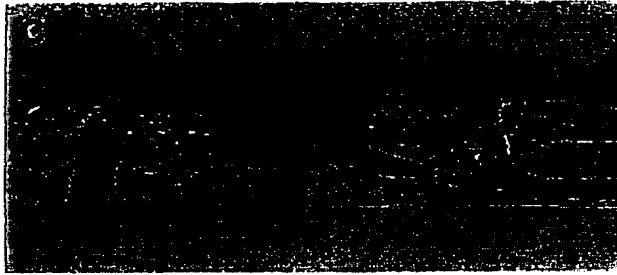
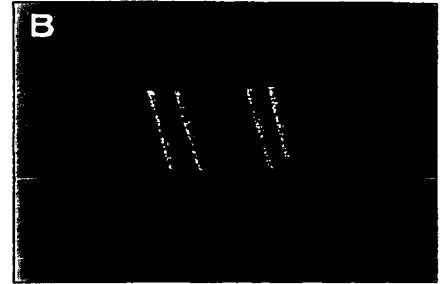
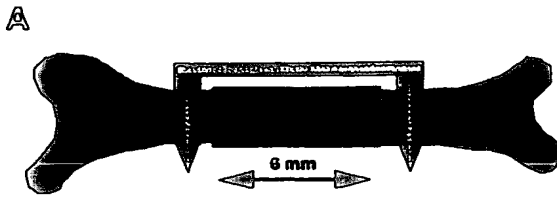
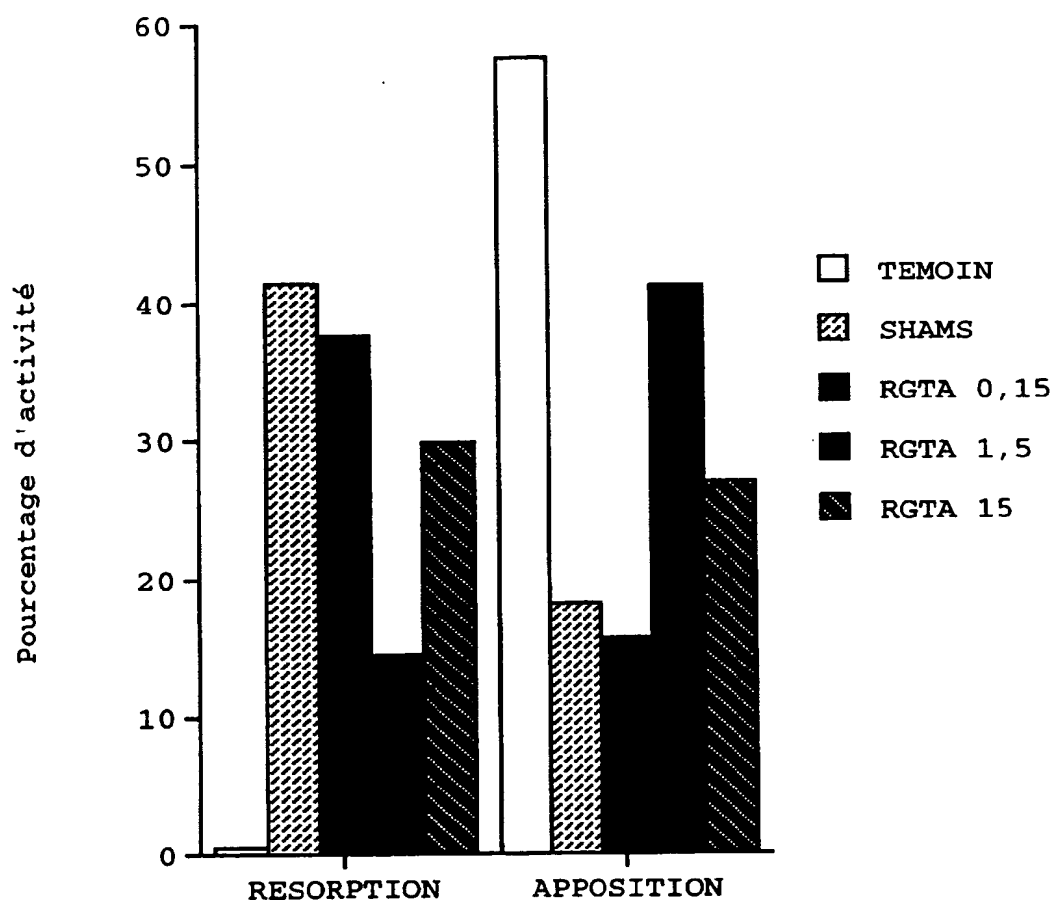


Fig.29



30/30

Fig.30



Effets des RGTA sur la régulation de la masse osseuse et sur la
qualité de son remodelage :
Exemple d'une parodontie chronique

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 561087
FR 9809309

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|---|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| X | MAIGA-REVEL O ET AL: "NEW INVESTIGATIONS ON HEPARIN-LIKE DERIVATIZED DEXTRANS: CMDDBS, SYNERGISTIC ROLE OF BENZYLAMIDE AND SULFATE SUBSTITUENTS IN ANTICOAGULANT ACTIVITY" CARBOHYDRATE POLYMERS, vol. 32, no. 2, février 1997, pages 89-93, XP000686949 * tableau 1 * | 1-14 |
| X | DE 11 52 396 B (VEB SERUM-WERK BERNBURG) 8 août 1963 * colonne 2, ligne 26 - ligne 44 * | 1-14 |
| X | DATABASE WPI Week 7241 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 65506T XP002097795 & SU 328 094 A (MOSCOW GUBKIN PETROCHEMIC) * abrégé * | 1 |
| A | A. MEDDAHI ET AL.: "Inhibition by dextran derivatives of FGF-2 plasmin-mediated degradation." BIOCHIMIE, vol. 77, no. 9, 1995, pages 703-706, XP002097794 | |
| | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6) |
| | | C08B C08G A61K |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur |
| 24 mars 1999 | | Lensen, H |
| <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | |

3
EPO FORM 1503 03 82 (P04C13)

THIS PAGE LEFT BLANK